

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Grégory VERHOEST

Préparée à l'unité de recherche CNRS/UMR 6290
Unité KyCa – Kidney Cancer: Molecular basis of Tumorigenesis
IGDR – Institut de Génétique et de Développement de Rennes
BIOSIT – Faculté de Médecine
Université Rennes 1

**Développement et mise au point de modèles murins de
xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires, et
évaluation de la réponse de l'association d'un antagoniste
des récepteurs à l'angiotensine-II au sunitinib.**

Thèse soutenue à Rennes le 16 Juin 2014

devant le jury composé de :

Pr Alain RAVAUD

Professeur des Universités (PUPH)
Université de Bordeaux / *Rapporteur*

Pr Gaëlle FROMONT

Professeur des Universités (PUPH)
Université de Tours / *Rapporteur*

Pr Jean-Jacques PATARD

Professeur des Universités (PUPH)
Université Paris 11 / *Examineur*

Pr Karim BENSALAH

Professeur des Universités (PUPH)
Université Rennes 1 / *Examineur*

Pr Cécile VIGNEAU

Professeur des Universités (PUPH)
Université Rennes 1 / *Directrice de Thèse*

Remerciements

SOMMAIRE

INTRODUCTION	8
SYSTEMES PRONOSTIQUES DANS LE CANCER DU REIN METASTATIQUE	10
LE GENE VHL	11
a- Historique	11
b- Structure du gène VHL	12
LE VEGF : MOLECULE CLE DE L'ANGIOGENESE TUMORALE	15
a- la famille VEGF	15
b- Les récepteurs VEGF	17
c- Production de VEGF et mécanismes moléculaires de régulation de l'expression de VEGF	19
TRAITEMENTS MEDICAUX DES CANCERS DU REIN METASTATIQUE	22
SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE ET CANCEROLOGIE	26
a- Méta-analyses	26
b- Etudes de registres	28
c- Etudes rétrospectives	30
SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE ET CANCERS UROLOGIQUES	32
1 ^{er} article publié : article de Revue publié dans la Revue <i>Progrès en Urologie</i>	
OBJECTIFS	33
RESULTATS	34
A- 2 ^{ème} article publié dans le Revue <i>BioMed Research International</i> : Sunitinib combined to angiotensin-2 type-1 receptor antagonists induces more necrosis: a murine xenograft model of renal cell carcinoma.	
B- Supplementary data: statistical analysis	37
C- Conclusion	41
D- Mise au point d'un modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires issu de lignées primaires.	42
a. Lignées primaires sélectionnées	42

b. Mise au point du modèle animal	45
c. Evaluation des traitements sur le modèle mis au point	52
d. Discussion	59
 CONCLUSION	 63
BIBLIOGRAPHIE	64
ANNEXES	72
RESUME	75

INTRODUCTION

Le carcinome à cellules rénales (CCR) représente actuellement 3% de l'ensemble des tumeurs malignes de l'adulte et se situe au 3^{ème} rang des cancers urologiques chez l'homme après le cancer de prostate et le cancer de vessie, et au 2^{ème} rang chez la femme après le cancer de vessie¹. Le type histologique le plus fréquemment observé est le carcinome rénal à cellules claires (CRCC), qui représente près de 85% des sous-types histologiques. C'est le cancer urologique qui a la mortalité la plus élevée. A l'heure actuelle, près de 40% des patients atteints d'un cancer du rein décèdent de leur maladie, comparés à 20% des patients atteints d'un cancer de la vessie ou de la prostate. Environ 20% des patients ont des métastases au moment du diagnostic et presque 20 à 30% des patients en développeront au cours de leur maladie. Pour les patients métastatiques, le pronostic est très sombre avec moins de 50% de survie à 1 an, 5% à 30% de survie à 5 ans et de 0% à 5% de survie à 10 ans². Malgré des critères pronostiques reconnus, comme le grade nucléaire de Fühman ou le stade TNM, les CCR gardent une évolution imprévisible.

Sur le plan épidémiologique, les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes avec un sex-ratio de 3/1. Ce cancer atteint préférentiellement l'homme de 60 ans, le sex-ratio passant même à près de 4/1 après 50 ans (soit après la ménopause)³. C'est un cancer qui reste rare chez l'adulte jeune, puisque seulement 6 % des patients atteints sont âgés de moins de 40 ans⁴. L'incidence du cancer du rein augmente régulièrement en Amérique du Nord et en Europe d'environ 3% par an depuis les années 1970. Selon les données de l'Institut National de Veille Sanitaire et la Haute Autorité de Santé, 11 092 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France en 2011. L'augmentation de l'incidence montre une progression de 7,8 à 12,2 pour 100 000 habitants en 20 ans³.

Trois explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- l'augmentation du nombre de tumeurs diagnostiquées à un stade précoce, due à l'utilisation répandue des techniques d'imagerie abdominale (échographie et scanner, voire IRM) effectuées le plus souvent dans le cadre de l'exploration d'autres pathologies. La révélation fortuite de petites masses rénales est actuellement le mode de découverte le plus fréquent⁵.
- Le vieillissement global de la population des pays industrialisés⁴.
- Le rôle croissant de facteurs favorisant environnementaux, bien que ce dernier argument ne soit clairement établi⁶.

Avec l'avènement de la génétique moléculaire, des espoirs sont nés dans l'établissement de nouveaux outils diagnostiques et pronostiques. De plus, l'émergence de nouvelles thérapeutiques utilisant les concepts de pharmaco-génomique fondés sur les gènes et leurs fonctions, a permis la mise en oeuvre de nouvelles stratégies. Ces nouvelles thérapeutiques dites « ciblées » s'attaquent à certains processus plus spécifiquement « malins » comme la prolifération cellulaire et l'angiogénèse. Dans les carcinomes à cellules claires richement vascularisés, des molécules anti-angiogéniques (anti-VEGF, anti-PDGR ou anti-EGFR) ont fait la preuve de leur efficacité, et ont totalement bouleversé la prise en charge des patients atteints de CCR⁷. L'enjeu principal réside à l'heure actuelle dans la détermination de marqueurs de réponse et d'efficacité au traitement mis en place.

Systèmes pronostiques dans le cancer du rein métastatique

Si le système TNM joue un rôle majeur dans la prédiction pronostique des tumeurs localisées, il n'en est pas de même pour les lésions métastatiques. Il est donc important d'identifier d'autres paramètres pertinents, biologiques ou moléculaires. Trois principaux modèles sont utilisés à l'heure actuelle en pratique clinique :

- Elson et *al.* furent les premiers à développer un modèle pour classer les patients métastatiques en 5 catégories, en s'appuyant sur l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), le temps entre le diagnostic et la survenue de métastases, l'amaigrissement, la chimiothérapie première, et le nombre de sites métastatiques⁸. En fonction des 5 catégories, la survie médiane allait de 2,1 à 12,8 mois.

- Le modèle de Motzer était le plus utilisé jusqu'à récemment. Il est basé sur le taux de LDH, d'hémoglobine, la calcémie corrigée, l'index de Karnofsky basé sur l'état général et la réalisation préalable d'une néphrectomie. En fonction du nombre de paramètres, il en résulte la définition de 3 groupes pronostiques, dont les survies étaient de 20, 10 et 4 mois^{9, 10}.

- Le modèle de Heng est actuellement le plus utilisé. Il correspond au modèle de Motzer, à la différence que le taux de LDH n'est plus pris en compte, et remplacé par le taux de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes. En fonction du nombre de paramètres, il en résulte la définition de 3 groupes pronostiques, dont les survies étaient de 37, 28 et 9 mois¹¹.

Les systèmes actuels sont pour le moment pris en défaut dans la maladie métastatique du fait de leur manque de performance. L'évaluation du risque dans cette situation se décline plus particulièrement en terme de prédiction de réponse à un traitement. C'est pourquoi l'introduction de variables biologiques et moléculaires dans des systèmes pronostiques est un élément clé de la progression métastatique et de la réponse aux thérapeutiques ciblées.

Le gène VHL

a) Historique

Les premiers indices de la localisation chromosomique du gène viennent d'une étude réalisée en 1979 par Cohen et *al.* chez une fratrie atteinte d'une forme familiale de cancer rénal sporadique à cellules claires. Dans cette famille, les individus atteints de cancer du rein avaient tous une translocation réciproque équilibrée tr (3p14; 8). En 1982, Pathak et *al.* rapportait une autre famille atteinte de cancer rénal avec une translocation tr (3; 11) retrouvée au sein des cellules tumorales. En 1989, Kovacs et *al.* signalait une troisième famille dans laquelle ils retrouvaient une translocation tr (3; 6). Ainsi le point commun de ces 3 familles était une atteinte du bras court du chromosome 3, le point de cassure pouvant se situer au niveau d'un gène impliqué dans le contrôle de la croissance tumorale, gène fonctionnant sur un mode "suppresseur de tumeur".

Entre 1990 et 1993 un consortium international a été formé pour mettre en évidence le gène *VHL*¹². Ainsi de nombreuses études de liaisons génétiques portant sur les cancers du rein à cellules claires tant sporadiques que liés à la maladie de von Hippel-Lindau ont permis, grâce aux stratégies de clonage positionnel, de localiser le gène candidat sur le bras court du chromosome 3 en position 3p25-26. La mise en évidence de délétions régionales chez 3 patients VHL issus de familles différentes fut le point de départ de l'isolement du gène.

La maladie de Von Hippel-Lindau est donc un syndrome familial de prédisposition aux cancers, associé à des néoplasmes malins ou bénins, surtout hémangioblastomes rétiens, cérébelleux, de la moelle épinière, carcinomes des cellules rénales et phéochromocytome. La prévalence est estimée à 1/53 000, et l'incidence annuelle à la naissance est de 1/36 000¹³. La maladie peut survenir à tout âge (en moyenne à 26 ans) et débute habituellement avec des

hémangioblastomes rétiens multiples et bilatéraux dans 50% des cas. Ils sont souvent asymptomatiques mais peuvent provoquer un décollement de la rétine, un oedème maculaire, un glaucome et une perte de vision. Les hémangioblastomes du système nerveux central sont révélateurs dans 40% des cas, et sont observés chez 60 à 80% des patients. Ils sont surtout localisés dans le cervelet mais aussi dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Ils sont bénins mais peuvent être symptomatiques par compression des tissus adjacents. Dans le cervelet, ils entraînent généralement une hypertension intracrânienne, des céphalées, des vomissements et une ataxie des membres et du tronc. La formation de kystes rénaux multiples est très fréquente avec un risque très élevé de CCR. Certains phéochromocytomes peuvent être asymptomatiques ou causer une hypertension. Des kystes de l'épididyme, des cystadénomes (60% des hommes) peuvent apparaître, ainsi que des kystes multiples du pancréas (majorité des cas), des ilots tumoraux pancréatiques non sécrétoires ou des tumeurs du sac endolymphatique avec perte de l'audition (10% des cas). Les paragangliomes de la tête et du cou sont rares. L'âge moyen au diagnostic de tumeurs est inférieur à celui des cas sporadiques, avec une importante variabilité intrafamiliale¹³.

b) Structure du gène VHL

Le gène *VHL* localisé en 3p25-26 couvre environ 14,5 Kb. Il comporte 3 exons, respectivement de 553 pb, 123 pb, 2292 pb. C'est un gène suppresseur de tumeur qui répond à la théorie de Knudson du « double hit », soit de 2 événements mutagéniques successifs : le plus souvent un allèle est délété par perte d'un fragment chromosomique, l'autre allèle est muté (environ 60%) ou bien méthylé (15%)¹⁴.

De manière très intéressante, il a été démontré que le gène *VHL* était inactivé dans près de 70% des cancers du rein sporadiques¹⁵⁻¹⁷. Ce gène code pour une protéine de 213 acides aminés qui est le substrat de reconnaissance d'un complexe ubiquitine ligase qui va cibler un

facteur de transcription protéique : Hypoxia-Inducible Factor (HIF)¹⁸⁻²⁰. La protéine pVHL en effet se lie à 2 facteurs de transcription: Elongin B et C^{21, 22} qui vont eux même se lier à l'Elongin A, constituant un complexe trimérique appelé Elongin/SIII²³. pVHL a aussi un rôle majeur dans la formation de la matrice extracellulaire et dans le contrôle du cycle cellulaire. HIF-1 se lie à un hétéro dimère constitué d'une sous unité alpha (HIF-1 α) et d'une sous unité bêta (HIF-1 β). Les sous unités α sont normalement rapidement dégradées en présence d'oxygène alors que les sous unités β sont présentes de manière constitutionnelle²⁴. HIF-1 α contrôle la transcription d'un certain nombre de gènes dit induits par l'hypoxie. En effet en condition normoxique, le complexe VHL Elongin C/B-Cul2 cible HIF-1 α conduisant à une dégradation protéosomale^{25, 26} (Figure 1). En condition hypoxique aussi bien qu'en cas d'inactivation de *VHL*, le complexe pVHL ne dégrade pas HIF-1 α qui s'accumule alors dans le noyau conduisant à une surexpression de gènes qui sont critiques pour :

- l'angiogenèse (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)
- le transport du glucose (GLUT1, GLUT3)
- la glycolyse (6-phosphofructose 2-kinase)
- le contrôle du pH (famille des anhydrases carboniques)
- la prolifération épithéliale (Platelet Derived Growth Factor: PDGF, Transforming Growth Factor- α : TGF- α)
- l'érythropoïétine (EPO)
- l'apoptose (Bid, Bax, Bad)²⁵.

Parmi tous ces gènes qui s'activent en aval du complexe HIF/VHL: VEGF, VEGFR et PDGFR sont les cibles les plus explorées.

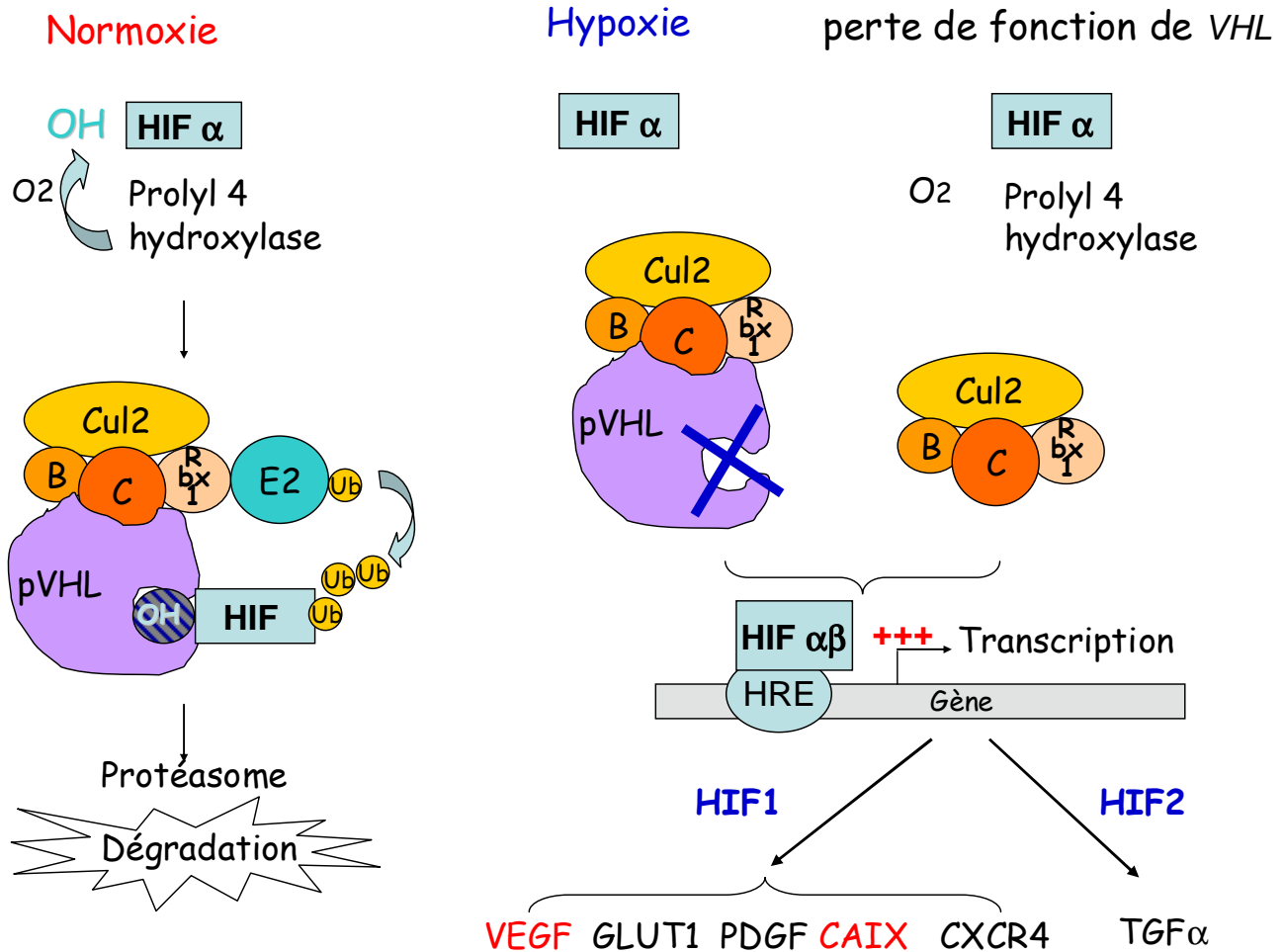


Figure 1 : La voie VHL/HIF et les gènes cibles (d'après Fergelot et al.²⁷).

En condition normoxique, la dégradation de la sous-unité HIF α dépend de son hydroxylation et de la liaison de pVHL aux Elongines B, C, Cul2 et Rbx1 pour former un complexe ubiquitine ligase. HIF α 1 et HIF α 2 sont constitutionnellement exprimés soit en situation hypoxique, soit en cas d'inactivation de VHL. La stabilisation de HIF α entraîne une activation des gènes cibles tels que VEGF et PDGF. HIF α 2 active TGF α et est considéré comme la forme oncogénique de HIF α .

Le VEGF : molécule clé de l'angiogénèse tumorale

L'induction de l'angiogénèse est un mécanisme indispensable au développement des tumeurs au delà de 1 à 2 cm de diamètre. Le VEGF ou VEGF-A et les molécules apparentées (VEGF-C et VEGF-D) sont de puissants facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la croissance tumorale et la survenue de métastases. Leur voie de signalisation cellulaire, relayée par des récepteurs spécifiques (VEGFRs) à activité tyrosine kinase, est une des cibles principales des traitements anti-angiogéniques ²⁸.

a. La famille VEGF

Le VEGF (VEGF-A) est une glycoprotéine homodimérique dont le gène, cloné en 1989 ^{29 30} comprend 8 exons et code une forme longue de 206 acides aminés. Par épissage alternatif des exons 6 et 7, plusieurs transcrits sont générés et les peptides produits diffèrent par leur capacité de liaison à l'héparine et aux protéoglycanes de type héparane sulfate, composant de la matrice extra-cellulaire. On distingue les isoformes 189, 183, 165, 148, 145, 121, d'après le nombre d'acides aminés de la protéine mature prédite, auxquelles s'est ajouté récemment le VEGF 162 ³¹. Une isoforme particulière, le VEGF165b ne possède pas d'exon 8, remplacé par un 9^{ème} exon potentiel ³² (Figure 2).

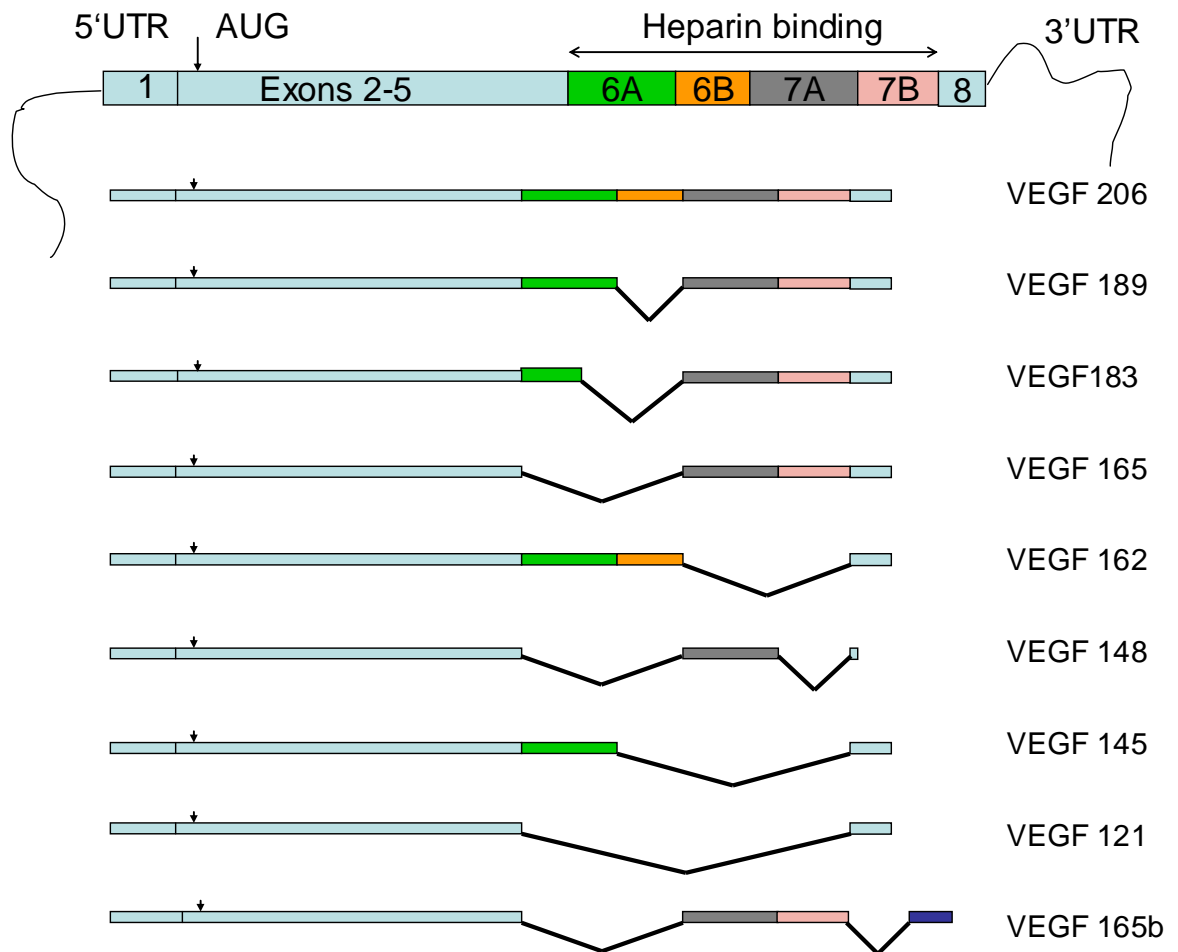


Figure 2 : Les différentes isoformes de VEGF (d'après Fergelot et al.²⁷).

Les formes surexprimées dans les processus d'angiogénèse physiologique et pathologique sont les VEGF 121, 165 et 189. Les homodimères de VEGF 189 sont retrouvés essentiellement attachés à la matrice extra-cellulaire, alors que les formes 121 et 165 sont solubles. Le VEGF 165 cependant partiellement lié à la matrice extracellulaire et à la membrane cytoplasmique apparaît prédominant aussi bien d'un point de vue quantitatif que fonctionnel. Dans les CCR, la co-expression des transcrits 121, 165 et 189 est associée aux stades T3-T4 et à la densité en micro vaisseaux ³³. De plus, il est intéressant de noter que le VEGF165b, dont l'expression est associée à une croissance tumorale lente, correspondrait à une isoforme inhibant l'activité du VEGF 165 ³⁴. Le transcrit 165b a été retrouvé sous-

exprimé dans les tumeurs rénales ³². L'altération de la régulation de l'épissage du VEGF pourrait donc être un phénomène important dans l'évolution spontanée d'une tumeur dont l'implication dans la physiopathologie du cancer rénal reste à préciser. D'autre part, il apparaît que les formes mesurables dans le sérum ne reflètent pas exactement les différentes formes du VEGF actives dans un tissu. Enfin, des modulateurs de la biodisponibilité du VEGF sont identifiés régulièrement, ainsi une métalloprotéase, ADAMTS1, est capable de se lier directement au VEGF 165 et de le séquestrer ³⁵.

Deux autres membres de la famille VEGF ont un rôle important dans l'angiogénèse tumorale : le VEGF-C ³⁶ et le VEGF-D ³⁷. Ces deux molécules sont liées structurellement et fonctionnellement. Elles diffèrent toutes deux du VEGF par la présence de propeptides à leurs extrémités, mais possèdent le domaine central d'homologie au VEGF (VHD) contenant la cystine knot, motif caractéristique des membres de cette famille. La forme active, le VHD, naît du clivage des propeptides par des protéases extracellulaires inconnues à ce jour. L'expression du VEGF-C est stimulée par des facteurs de croissance tels que le PDGF et l'EGF mais pas par l'hypoxie. L'expression de ces facteurs dans des modèles cellulaires et animaux a bien montré leur implication dans l'extension métastatique ³⁸.

b. Les récepteurs VEGF

Trois récepteurs spécifiques de la famille VEGF ont été identifiés VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/FLK-1) et VEGFR3 (FLT-4). Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le VEGFR 2 s'associe aux isoformes 121, 145 et 165 du VEGF, au VEGF-C et au VEGF-D. Son rôle serait primordial dans la différenciation des cellules endothéliales ³⁹. Le VEGFR3 a pour ligand les VEGFs C et D (Figure 3). Le VEGFR2 est exprimé principalement à la

surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et plus faiblement sur les lymphatiques^{40, 41}. Le VEGFR3 est exprimé sur les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins tumoraux⁴². VEGFR3 a été corrélé positivement au VEGF-C dans des lysats de tumeurs rénales⁴³. Un rôle dans l'angiogénèse et la lymphangiogénèse est maintenant clairement établi pour le VEGFR2 et le VEGFR3, respectivement. Bien que documentée dans certains types de tumeur, leur implication dans l'extension métastatique des cancers du rein reste à démontrer.

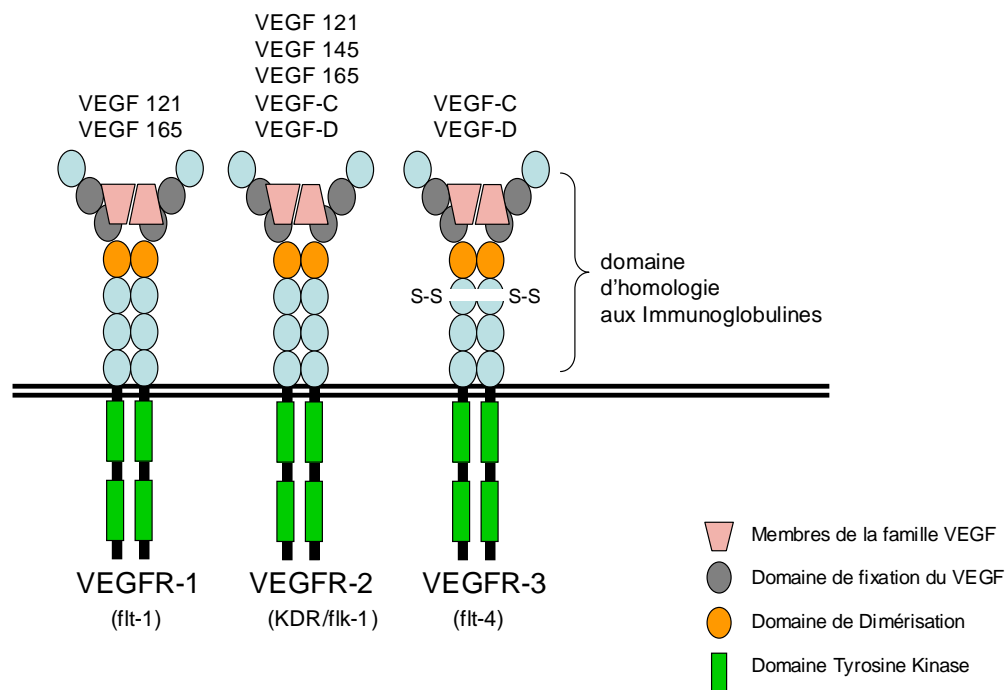


Figure 3 : Les récepteurs VEGF et leurs ligands respectifs. La liaison des ligands au récepteur transmembranaire active sa dimérisation et la transduction du signal. VEGFR2 est essentiel pour la prolifération des cellules endothéliales sanguines tumorales, alors que VEGFR3 médie la prolifération des vaisseaux lymphatiques. Le rôle de VEGFR1 dans l'angiogénèse tumorale est à l'heure actuelle encore mal défini (d'après Fergelot et al.²⁷).

c. Production de VEGF et mécanismes moléculaires de régulation de l'expression du VEGF

L'expression du VEGF est contrôlée par des mécanismes de régulation complexes, dans lesquels interviennent de nombreux facteurs comme les cytokines, les facteurs de croissance et les hormones ⁴⁴. La surproduction de VEGF retrouvée dans les tumeurs peut être rattachée à plusieurs mécanismes auxquels participe le facteur HIF⁴⁵ :

- L'hypoxie :

L'hypoxie des cellules les plus éloignées des vaisseaux sanguins stimule la production de VEGF par un mécanisme transcriptionnel, l'activation de la synthèse d'ARN messager par le facteur HIF et deux mécanismes traductionnels, aboutissant tous à une augmentation de la synthèse de protéine. L'un de ces mécanismes traductionnels passe par la stabilisation de l'ARN messager. Il nécessite la liaison d'un facteur protéique sur une portion déterminée de l'extrémité 3' non traduite du transcrit (3'UTR) ⁴⁶. La protéine HuR a été identifiée comme l'un de ces facteurs ⁴⁷. Le deuxième mécanisme fait appel à l'extrémité 5' non traduite du transcrit (5'UTR) et implique le codon d'initiation CUG. Ce codon serait utilisé préférentiellement dans des conditions de stress hypoxique connues pour inhiber la traduction dépendante de la coiffe (Cap-dependent translation) initiée classiquement au codon AUG ⁴⁸. Une étude récente montre que, de façon surprenante, la nature du transcrit contrôlerait la reconnaissance du codon initiateur par la machinerie traductionnelle ⁴⁹. Ainsi en considérant les trois isoformes principales, la forme 121 n'est produite qu'à partir du CUG, la forme 165 à partir des codons de façon équivalente et la forme 189 à partir de l'AUG classique. Ceci

suggère que l'hypoxie pourrait favoriser la production des isoformes solubles 121 et 165 par les cellules tumorales en activant la traduction des transcrits.

- Le gène suppresseur de tumeur *VHL* :

Dans les carcinomes à cellules rénales de type conventionnel, la perte de fonction de gène *VHL* est un mécanisme clé de l'angiogénèse tumorale potentialisant les effets de l'hypoxie sur le VEGF. Les conséquences des altérations du gène *VHL* sont de deux ordres :

- une activation de la transcription du gène *VEGF* due à l'expression constitutive du facteur HIF et à la levée de l'inhibition du facteur de transcription Sp1⁵⁰
- une stabilisation des transcrits VEGF⁵¹.

Une étude récente suggère que l'association de *VHL* à la protéine HuR favoriserait la dégradation des transcrits. A l'inverse, l'absence de *VHL* entraînerait comme l'hypoxie la stabilisation de l'ARN messager par fixation de HuR au 3'UTR⁵².

- La voie de signalisation Ras :

A coté de la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur, l'activation de l'oncogène *ras*, telle qu'elle a été montrée dans les cancers du rein^{53, 54} pourrait stimuler la production de VEGF. Raf induirait la transcription du gène VEGF par la voie de la protéine kinase C ζ (PKC ζ). Raf de même que la PI3-kinase pourraient conduire à l'activation de la PKC ζ ⁵⁵. Dans les tumeurs rénales, l'hypoxie, la perte de fonction de gène suppresseur de tumeurs comme *VHL* mais aussi *PTEN*⁵⁶ et l'activation oncogénique de voies de signalisation cellulaire sont impliquées dans la surexpression du VEGF. Les deux voies Raf-MAPK et PI3-

AKT/mTOR seraient impliquées dans l'activation du VEGF, en coopérant avec HIF, dont l'activité est elle-même augmentée par ces voies de signalisation et l'hypoxie⁵⁷. Il est toutefois important de considérer que ces mécanismes, démontrés in vitro, ne sont pas forcément effectifs in vivo au même stade du développement tumoral, ni dans les mêmes cellules.

Traitements médicaux des cancers du rein métastatique

Les traitements médicaux cytotoxiques usuels comme le 5-FU, la vinblastine, de même que la radiothérapie sont des traitements inefficaces dans le cancer du rein⁵⁸. Jusqu'au début des années 2000, seuls les traitements cytokiniques systémiques tels que l'Interféron- α ou l'Interleukine-2 étaient utilisés, permettant une réponse tumorale faible mais supérieure aux chimiothérapies conventionnelles. Une réponse tumorale était ainsi obtenue chez 16,5% des patients avec l'Interféron- α , et la survie était allongée de 15 mois⁵⁹.

Par la suite, l'avènement des thérapies ciblant la néo-angiogénèse tumorale a révolutionné la prise en charge et le pronostic de ces patients. Ces thérapies dites « ciblées » sont représentées par plusieurs classes thérapeutiques :

- les inhibiteurs du facteur de croissance VEGF (*bevacizumab*) : cet anticorps monoclonal recombinant humanisé se fixe au VEGF circulant et neutralise sa liaison au VEGF-R des cellules endothéliales⁶⁰.
- les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (*sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib*) : le sunitinib inhibe les VEGF-R1 et 2, les PDGF-R α et β , le stem-cell growth factor (c-kit) et la Fms-like tyrosine kinase-3 (Flt3)⁶¹. En bloquant plusieurs voies de transduction, ces médicaments multicibles ont une action à la fois sur l'angiogénèse, la prolifération tumorale et l'apoptose.
- les inhibiteurs de la Mammalian Target of Rapamycin ou m-TOR (*temsirolimus, everolimus*). mTOR est une protéine kinase cytoplasmique active sous forme de complexe et jouant un rôle de régulateur central de la croissance et de la prolifération cellulaires, de l'angiogénèse et du métabolisme cellulaire. Elle se situe au carrefour de 2 grandes voies de signalisation entre angiogénèse et apoptose⁶².

Concernant le sunitinib, premier traitement développé et considéré jusqu'à présent comme le traitement de référence, une étude de phase III l'a comparé en 1^{ère} ligne à l'Interféron- α chez 750 patients atteints d'un ccRCC métastatique. Une différence significative était observée en faveur du bras sunitinib avec une survie sans progression presque doublée, passant de 5 à 11 mois ($p < 0,001$), ainsi que pour la survie globale passant de 14 à 28 mois. Les taux de réponses globales étaient de 44% dans le bras sunitinib et de 6% dans le groupe Interféron- α ⁹.

A l'échelon moléculaire, l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinases s'explique par l'inhibition compétitrice des sites de phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase. La molécule se fixe alors de manière réversible sur les sites de liaison de l'ATP des domaines kinases, empêchant ainsi l'activation des voies de signalisation d'aval (Figure 4). Le sunitinib va ainsi inhiber les voies liées au VEGF-R2 principalement, mais aussi à d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase du fait d'une grande homologie entre les domaines kinases tels que le VEGF-R1, VEGF-R3, PDGF-R, fms-related tyrosine kinase-3 (FLT3), colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), Kinase Tyrosine (c-KIT), et REarranged during Transfection (RET)⁶³. De fait, cette phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase va entraîner par rétrocontrôle une sécrétion et un relargage de VEGF dans le sang circulant.

Les traitements TKI ont des effets secondaires fréquents, notamment rénaux avec le développement d'HTA parfois sévère⁶⁴, de protéinuries et d'insuffisance rénale, des microangiopathies thrombotiques^{65, 66, 67}. Des effets secondaires cardiaques peuvent également survenir avec développement d'insuffisance cardiaque même en dehors de l'HTA⁶⁸. L'histologie rénale et la physiologie de ces effets secondaires a été pour l'instant peu étudiée, notamment parce que les patients traités pour cancer du rein sont néphrectomisés avant le traitement et que la présence d'un rein unique contre-indique la biopsie rénale sur le rein restant. On peut cependant remarquer la similitude clinique entre les effets secondaires des TKI (HTA et protéinurie) et la pré-éclampsie, situation clinique associant en fin de

grossesse une HTA sévère et une protéinurie parfois majeure. La prééclampsie s'accompagne d'ailleurs d'une élévation du sFLT1 circulant, récepteur soluble du VEGF et qui peut donc être assimilé au bevacizumab. Comme cela a été démontré dans l'étude multicentrique française RARe sur des biopsies rénales de patients sous anti-angiogéniques, la protéinurie s'explique par des anomalies des protéines constituant le diaphragme de fente du glomérule, structure assurant l'imperméabilité du glomérule aux grosses protéines, avec une diminution de l'expression dans les podocytes de la néphrine, de la synaptopodine et de la podocine^{69, 70}. De nombreux modèles expérimentaux ont démontré que le blocage de la fixation de l'angiotensine-2 à son récepteur AT1-R entraînait une diminution de la sécrétion de VEGF-A par les cellules tumorales^{71, 72}. L'utilisation de cette classe d'anti-hypertenseur (ARA-2) présente donc potentiellement tout son intérêt dans le ccRCC.

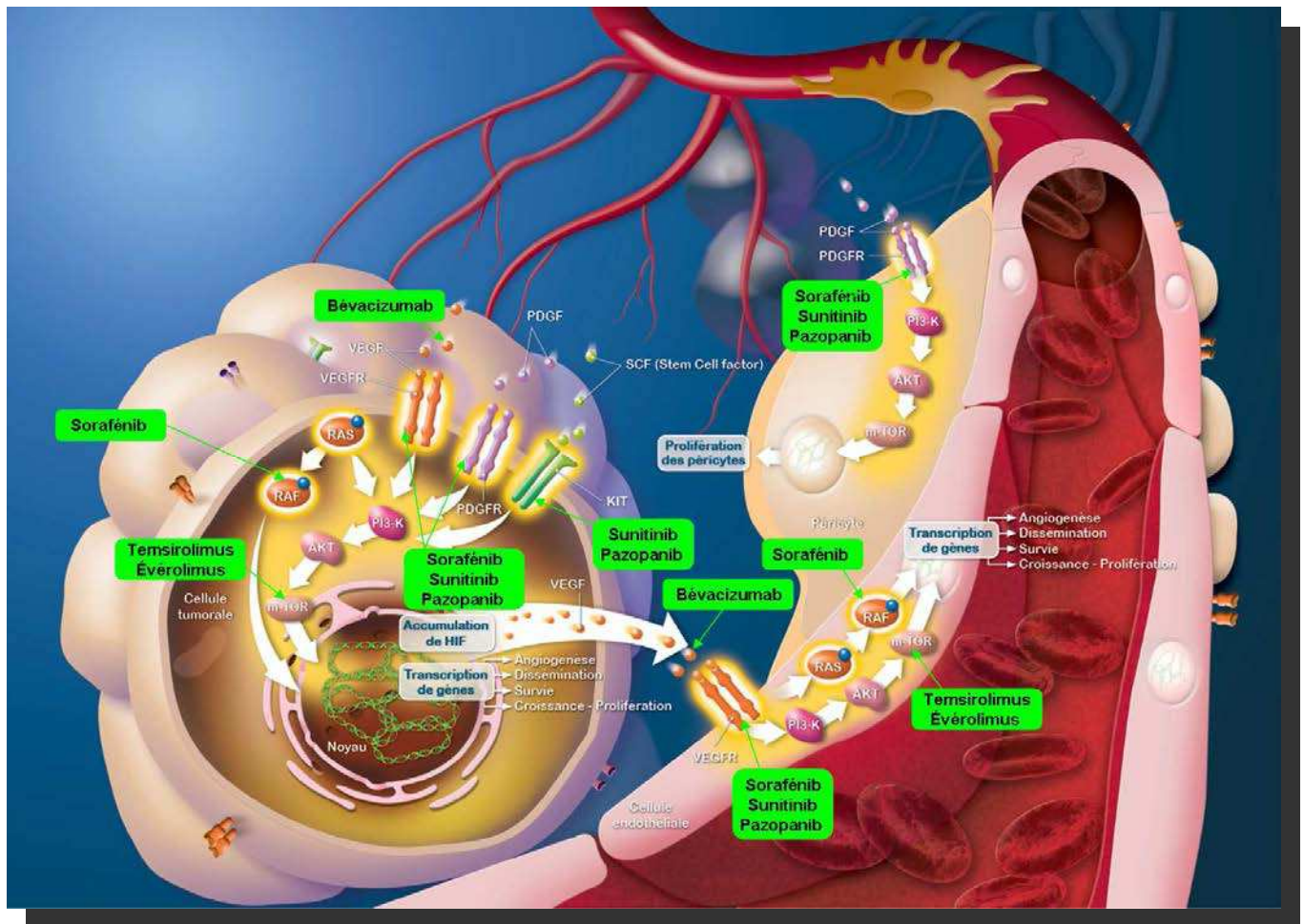


Figure 4 : Sites d'action des différents traitements anti-angiogéniques (TKI et inhibiteurs de m-TOR) au niveau cellulaire et vasculaire.
(K. Bensalah – Congrès AFU 2013)

Système rénine-angiotensine et cancérologie

Depuis plusieurs années une controverse agite également la littérature médicale sur le rôle que pourrait jouer l'utilisation des ARA-2 et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sur l'incidence des cancers chez l'homme. Les données épidémiologiques actuelles et l'analyse *post hoc* de grandes études, qui ont conduit à un recours en première intention aux bloqueurs du SRA dans les maladies cardiovasculaires et néphrologiques, sont contradictoires quant à l'influence de ces traitements sur la survenue des cancers.

Les données de la recherche fondamentale sont, quant à elles, toutes concordantes et montrent un rôle anti-tumoral des bloqueurs du SRA. Les mécanismes impliqués sont principalement un blocage de la prolifération cellulaire tumorale et une inhibition de la néo-angiogénèse.

Données issues des études cliniques

a/ Méta-analyses

Une large méta-analyse avec analyse *post-hoc* parue en 2010 a ouvert le débat actuel en discréditant l'utilisation des ARA-2⁷³. Ce travail répertorie les principales études cliniques parues avant novembre 2009, portant sur l'emploi des ARA-2 et incluant au moins 100 patients.

L'incidence des cancers (68 402 patients issus de 5 études : LIFE, TROPY, TRANSCEND, ONTARGET et PROFESS) et des décès par cancer en fonction de l'utilisation ou non d'ARA-2 (93 515 patients issus des 5 études précédentes et de 3 supplémentaires : OPTIMAAL, VALIANT et VAL-HEFT) ont été étudiés. D'après ce travail, l'incidence des cancers est significativement augmentée mais la mortalité spécifique par cancer n'est pas modifiée. De nombreux biais modèrent cependant les résultats de cette

analyse et ont été exposés dans des lettres de réponse ⁷⁴. Tout d'abord, il s'agit d'analyses *post-hoc*, pour lesquelles le risque tumoral n'était jamais l'objectif principal et rarement un objectif secondaire. Pour certaines, les données concernant la survenue de cancers ont été récupérées secondairement. Les auteurs n'ont parfois pas été contactés pour la récupération des données ce qui interroge sur l'exactitude et l'exhaustivité des données analysées. De plus, la durée de suivi, en moyenne 3,5 années et n'excédant jamais 5 années, a souvent été trop courte pour que les événements néoplasiques apparaissent en nombre suffisant pour être analysables. Les groupes contrôles de ces différentes études n'étaient pas homogènes, et ont aussi bien pu recevoir un placebo (TRANSCEND), un β -bloquant (LIFE) un IEC (OPTIMAAL et VALIANT) ou l'association d'un IEC et d'un ARA-2 (PROFESS). Enfin et le plus souvent, l'exposition des individus aux autres facteurs de risque de cancer, tel que le tabac n'était pas mentionnée. De nombreux biais peuvent donc être soulevés et remettre en question les conclusions de cette première méta-analyse.

Suite aux nombreuses critiques méthodologiques parues dans la littérature, les auteurs de ce travail ont repris leur étude ⁷⁵. Des travaux plus anciens (à partir de 1950) et publiés jusqu'en 2010 ont été pris en compte pour cette seconde méta-analyse avec la nécessité d'un suivi théoriquement plus long et supérieur à 1 an. Les études avec un groupe contrôle placebo ont été distinguées de même que l'utilisation d'ARA-2 ou d'IEC en monothérapie ou en association. Enfin, les auteurs ont voulu étendre leurs analyses à toutes les classes thérapeutiques anti-hypertensives. Par conséquent, des études complémentaires ont été analysées dans ce travail, incluant ainsi plus de 300 000 patients. Parmi les ARA-2, le telmisartan a été distingué des autres ARA-2, de même que les IEC à faible affinité tissulaire et ceux à forte affinité. Que ce soit pour les ARA-2 ou pour les IEC, en analyse globale ou de sous-groupe, aucune augmentation du risque de survenue de cancer et aucune augmentation de la mortalité par cancer n'est mise en évidence contrairement aux conclusions établies dans le premier article. L'analyse des associations IEC / ARA-2 n'a pas pu conclure en raison du

trop faible nombre de patients. Même si la méthodologie de cette seconde méta-analyse a été plus rigoureuse, demeurent toujours les problèmes relatifs à la durée de suivi, à l'exhaustivité du recueil des données concernant la survenue des cancers et l'exposition aux facteurs de risque classiques de cancer.

Dans une troisième méta-analyse parue en 2011 ⁷⁶ les auteurs n'ont repris que les études portant sur l'utilisation des ARA-2. La méthodologie est superposable à celle utilisée dans le second article de Sipahi et près de 140 000 patients ont été inclus. Aucune augmentation du risque de survenue de cancer n'a été mise en évidence. Les mêmes biais mentionnés pour les 2 premières méta-analyses demeurent.

b/ Etudes de registres

Les études de registres apportent des conclusions différentes de celles des méta-analyses, mentionnant même un potentiel rôle protecteur des ARA-2 dans la survenue des cancers !

Dès 1998, la question du lien entre l'utilisation des IEC et le risque de cancers avait été posée dans un travail publié dans le Lancet ⁷⁷. Dans un centre spécialisé dans l'hypertension artérielle (HTA) à Glasgow, à partir de 5 207 dossiers analysés entre 1980 et 1995, 4 930 patients ont reçu un traitement pharmacologique de l'HTA dont 1 559 des IEC. L'incidence des cancers des patients recevant des IEC a été comparée à celle des patients recevant un autre traitement anti-hypertenseur ou pas de traitement. La durée moyenne de suivi pour les 5 207 patients était de 6,6 ans, de 5,2 années dans le groupe IEC et de 7,2 années pour le groupe des autres molécules anti-hypertensives. L'exposition au tabac a été recueillie pour plus de 98% des patients inclus. Un appariement a été effectué sur l'âge et le sexe des patients. Les courbes de survie (Kaplan-Meier) mettaient en évidence un rôle protecteur des IEC par rapport aux autres molécules anti-hypertensives. Analysés séparément, les inhibiteurs calciques, les β -bloquants ou les diurétiques n'avaient aucun rôle sur le risque

de cancer. Les IEC sembleraient protéger plus efficacement contre l'apparition des cancers pulmonaires et mammaires, plus particulièrement chez les femmes et les fumeurs. Cependant, le principal biais de cette étude résidait dans la différence de durée de suivi entre les patients ayant reçu des IEC et les patients ayant reçu d'autres drogues. Ce qui pourrait favoriser les IEC même si les courbes de survie se séparent précocement. Par ailleurs, cette étude ancienne, a été réalisée avec des molécules dont l'activité et l'efficacité diffèrent des molécules actuellement prescrites et utilisées.

Une étude de registre d'assurance taïwanaise ⁷⁸ publiée en 2011, plus rigoureuse du point de vue méthodologique, semble confirmer les conclusions de Lever. Cette base de données comportait un million de taïwanais depuis le 1^{er} janvier 1998. Parmi ces personnes, presque 110 000 avaient été nouvellement diagnostiqués pour une HTA, et un peu plus de 40 000 avaient reçu des ARA-2. Les patients hypertendus recevant des ARA-2 ont été comparés aux autres patients hypertendus traités. La durée moyenne de suivi était de 5,7 ans +/- 2,6 ans. Les patients recevant des ARA-2 étaient un peu plus âgés : 59,3 ans *versus* 57,9 ans pour les patients non traités, plus souvent diabétiques et insuffisants rénaux chroniques ou nécessitant le recours des associations de molécules anti-hypertensives pour contrôler leur HTA. L'analyse de cette cohorte mettait en évidence que les ARA-2 diminuaient significativement l'incidence des cancers. Cet effet était plus marqué chez les patients âgés et si l'exposition aux ARA-2 était prolongée plus d'un an. Tous les ARA-2 étudiés semblaient avoir le même pouvoir protecteur. La protection semblait équivalente, quelque soit le type de cancer pris en compte. Des biais inhérent à ce type d'étude étaient présents, le principal étant l'absence de distinction entre les IEC et les autres drogues anti-hypertensives dans le groupe témoins.

A partir de ce même registre mais uniquement sur la population diabétique hypertendue, une étude cas-contrôle a été réalisée afin de rechercher un lien entre survenue de cancer et utilisation des ARA-2 ⁷⁹. Aucune augmentation du risque n'était montrée dans ce travail.

Enfin, une étude réalisée à partir d'un registre danois incluant plus de 400 000 patients a été publiée en 2011⁸⁰. Le but de ce travail était de comparer la survenue de cancers en fonction de l'utilisation des ARA-2 ou des IEC. Aucune différence significative n'était mise en évidence entre ces 2 types de molécules.

Ces données, issues des grandes études cardio-vasculaires et des registres, sont contradictoires et ne permettent pas de conclure. Seul un essai prospectif à grande échelle pour laquelle l'incidence des cancers serait l'objectif principal pourrait nous aider mais n'a pour le moment jamais été réalisé.

c/ Etudes rétrospectives

Quelques études rétrospectives à partir de séries de patients atteints de tumeurs ont été publiées récemment et mettent en évidence un intérêt pour les IEC et les ARA-2. En effet, dans ces études, ces classes thérapeutiques amélioreraient le pronostic des patients.

La survie de 287 patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules, localement avancé ou métastatique, traités entre 1996 et 2007 et provenant d'un seul centre allemand a été analysée en fonction l'utilisation à visée anti-hypertensive ou non d'IEC ou d'ARA-2⁸¹. Parmi ces patients, 52 avaient reçu un IEC ou un ARA-2. L'utilisation d'une de ces 2 classes thérapeutiques améliorait de 3,1 mois la survie globale médiane (11,7 mois *versus* 8,6 mois). Cet effet était indépendant des doses de sels de platine reçues ou de l'exposition aux facteurs de risque classiques.

Des résultats comparables ont été décrits plus récemment dans une série de carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques traités par sunitinib entre 2004 et 2010⁸². Parmi les 127 patients étudiés rétrospectivement, 44 ont reçu soit un IEC soit un ARA-2 et 83 aucune de ses deux classes thérapeutiques. Les patients traités par un bloqueur du SRA avaient une meilleure réponse au traitement et une survie sans progression améliorée. Pour ce même type

de tumeur, une publication rapportant 3 cas mentionnait que l'association de la cimetidine avec des IEC ou des ARA-2 semblait bénéfique en terme de survie⁸³.

Enfin, il a été montré que des patientes suivies pour des cancers du sein agressifs récidivaient moins si elles recevaient des IEC ou des ARA-2⁸⁴.

Ces différentes publications indiquent donc que l'utilisation de bloqueurs du SRA pourrait améliorer la réponse au traitement, la survie et diminuer le risque de récurrence des patients en cours de traitement pour un cancer.

Système rénine-angiotensine et cancers urologiques

Il s'agit d'un article de revue publié par notre équipe dans la revue Progrès en Urologie en Février 2014.

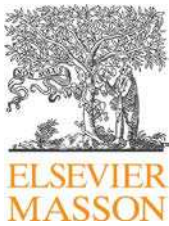
L'objectif était de faire le point sur l'implication du système rénine-angiotensine (SRA) dans les voies de cancérogénèse et son possible effet anti-tumoral dans les cancers urologiques.

Il expose dans un 1^{er} temps les principaux rôles du SRA et des récepteurs de l'angiotensine-II. Puis son implication dans la progression tumorale dans différents types de cancers est discutée au travers des travaux de recherche publiés *in vitro* comme sur modèles animaux. Enfin, nous reprenons les différentes publications dans les cancers urologiques (prostate, vessie et rein).

Concernant la prostate, dans des modèles résistants à la castration *in vitro* comme dans les modèles animaux, il était noté un ralentissement de la croissance tumorale avec des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine-II (ARA-2). Une seule étude chez l'homme est publiée montrant également une réduction des symptômes douloureux ainsi qu'une diminution du taux de PSA.

Dans la vessie, il existe peu d'études, toutes publiées par la même équipe japonaise. De la même façon, elles retrouvent un ralentissement de la croissance tumorale en inhibant l'angiogénèse.

Enfin dans le cancer du rein, plusieurs études sur des modèles cellulaires et animaux ont montré l'implication des ARA-2 dans le ralentissement de la croissance tumorale, comme de la progression métastatique. Chez l'homme, l'association d'un bloqueur du SRA à un TKI était associée à une meilleure survie sans progression.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLE DE REVUE

Système rénine-angiotensine et cancers urologiques



Renin-angiotensin system and urological cancers

G. Verhoest^{a,*}, T. Dolley-Hitze^{b,c}, F. Jouan^b,
K. Bensalah^a, Y. Arlot-Bonnemains^b, F. Dugay^{b,d},
M.-A. Belaud-Rotureau^{b,d}, N. Rioux-Leclercq^{b,e},
C. Vigneau^{b,c}

^a Service d'urologie, CHU de Rennes, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^b CNRS UMR6290/Biosit, faculté de médecine, université Rennes 1, 2, avenue du Professeur-Léon-Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

^c Service de néphrologie, CHU de Rennes, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^d Service de cytogénétique, CHU de Rennes, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^e Service d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU de Rennes, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

Reçu le 2 mai 2013 ; accepté le 13 septembre 2013

MOTS CLÉS

VEGF ;
Angiogénèse ;
Antagonistes des
récepteurs de
l'Angiotensine II ;
Inhibiteurs de
l'enzyme de
conversion

Résumé

Introduction. — Une grande controverse anime la littérature concernant le rôle potentiel du système rénine-angiotensine (SRA) dans la tumorigenèse. L'objectif de cette revue est donc de déterminer l'implication de cette voie en cancérologie, puis plus spécifiquement dans les cancers urologiques.

Matériel et méthode. — Une revue systématique de la littérature sur la base de recherche Pubmed a été effectuée en utilisant les mots clés suivants, seuls ou en combinaison : *cancer, renin, angiotensin, VEGF, AT1R, antagonists of angiotensin-2 receptors, inhibitors of angiotensinogen converting*.

Résultats. — De nombreux cancers (sein, estomac, vessie, astrocytome, glioblastome, ovaire, utérus, pancréas, rein, prostate, surrénale) expriment une forte concentration d'AT1-R dans les tissus tumoraux. L'Ang-II est alors capable d'induire l'expression du VEGF-A et ainsi favoriser la néoangiogenèse, mais aussi d'activer différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose. Plusieurs modèles animaux de xénogreffe ont démontré une efficacité anti-tumorale des bloqueurs du SRA, seuls ou en association aux thérapies, réduisant l'angiogenèse et la croissance tumorale. Des données cliniques issues de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : gregory.verhoest@chu-rennes.fr (G. Verhoest).

KEYWORDS

VEGF;
Angiogenesis;
AT1R;
Antagonists of
angiotensin-II
receptors;
Inhibitors of
angiotensinogen
converting enzyme

séries rétrospectives ont également mis en évidence une augmentation des taux de survie sans progression ou des taux de réponse chez des patients traités par des bloqueurs du SRA.

Conclusion. — De nombreuses données ont semblé démontrer l'implication de la voie rénine-angiotensine dans la carcinogenèse, ainsi qu'un effet anti-tumoral des bloqueurs du SRA, en complément des traitements anti-cancéreux. Des études cliniques sont à présent nécessaires pour confirmer ces données expérimentales.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary

Introduction. — A controversy animates the literature on the potential role of the renin-angiotensin system (RAS) in tumorigenesis. The objective of this review was to determine the involvement of this pathway in cancer, and more specifically in urological cancers.

Material and method. — We made a systematic review of articles referenced in Pubmed, using the following keywords alone or combined: *cancer, renin, angiotensin, VEGF, AT1R, antagonists of angiotensin-2 receptors, inhibitors of angiotensinogen converting*.

Results. — Many types of cancers overexpress AT1-R in their tumoral tissues (breast, stomach, bladder, astrocytoma, glioblastoma, ovary, uterus, pancreas, kidney, prostate, adrenal gland). Ang-II can induce VEGF-A expression and promote neoangiogenesis, but also can trigger different molecular pathways involved in cell proliferation or inhibit apoptosis. Several xenograft murin models demonstrated anti-tumoral efficacy of RAS blockers, alone or using combined therapies, targeting angiogenesis and slowing down tumor growth. Retrospective studies in patients have also revealed a better progression-free survival and a better response to therapies in those treated with RAS blockers.

Conclusion. — Many data seem to demonstrate the involvement of the RAS in carcinogenesis, as well as anti-tumoral effect of RAS blockers in addition to anti-cancer treatments. Clinical data are now expected to confirm these experimental findings.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Depuis de nombreuses années, les traitements visant à bloquer le système rénine-angiotensine (SRA) sont largement utilisés dans les maladies cardio-vasculaires et néphrologiques, et plus particulièrement dans la prise en charge de l'hypertension artérielle. Son rôle protecteur sur le système cardio-vasculaire et ses effets secondaires chez la femme enceinte ou les insuffisants rénaux ont été largement analysés dans les études précliniques mais aucune donnée n'existe concernant le risque oncologique de ces médicaments. Récemment, une controverse est apparue dans la littérature sur ce point au vu de plusieurs méta-analyses [1]. Si l'une en fait un facteur de risque d'augmentation de l'incidence des cancers, mais sans en modifier la survie spécifique [2], 2 autres sont venues par la suite contredire ces conclusions [3,4]. Néanmoins, de nombreux biais méthodologiques existaient dans ces différentes études dont ni l'objectif principal ni même les objectifs secondaires n'étaient d'évaluer le risque tumoral. La durée de suivi était de plus trop courte et les facteurs de risque usuels de survenue de cancers tel que le tabagisme n'étaient pas pris en compte [5]. Pour autant, plusieurs études de registres apportent des conclusions différentes, retrouvant même un rôle protecteur des bloqueurs du SRA [6,7]. Malgré les biais inhérents aux études rétrospectives, ce caractère protecteur a également été retrouvé chez des patients traités pour différents types de cancers comme le poumon, le sein ou le cancer du rein [8–10], améliorant la réponse aux traitements, la survie, tout en réduisant le risque de récurrence. Ces

travaux cliniques sont à mettre en regard de nombreux travaux scientifiques ayant porté sur des modèles cellulaires ou animaux. Ces derniers viennent renforcer l'hypothèse d'un rôle du SRA dans la carcinogenèse et surtout d'une action anti-tumorale des bloqueurs du SRA.

Du fait du rôle prépondérant de l'angiotensine-2 (Ang-II) dans l'embryogenèse de l'appareil urinaire et de l'expression intense de ses récepteurs dans le tissu rénal adulte, il est licite de se poser la question d'un lien spécifique entre SRA et cancers urologiques. La tumorigenèse est en effet un phénomène complexe faisant intervenir de nombreuses voies de signalisation, interagissant les unes avec les autres [11,12]. Dans cette revue de la littérature, l'effet anti-tumoral du SRA via l'Ang-II est exposé ainsi que son implication dans les cancers urologiques.

Matériel et méthode

Une revue systématique de la littérature sur la base de recherche Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a été effectuée en utilisant les mots clés suivants appartenant à l'arborescence Mesh, seuls ou en combinaison: *cancer, renin, angiotensin, VEGF, AT1R, antagonists of angiotensin-II receptors, inhibitors of angiotensinogen converting enzyme*. Tous les articles en langue anglaise et française ont été étudiés, sans sélection par rapport à l'impact factor de la revue, et sans limite d'accès par nos institutions (université Rennes 1, CNRS). Les études expérimentales sur des modèles cellulaires comme animaux, ainsi que les études cliniques rétrospectives dans différents types de cancer, les

méta-analyses ou revues de la littérature en anglais et en français ayant trait au SRA ont été sélectionnées.

Le système rénine-angiotensine

Principaux rôles du SRA

Le SRA consiste en une cascade d'interactions biochimiques aboutissant à la production d'Ang-II, effecteur majeur de cette cascade hormonale. C'est l'un des principaux complexes de régulation de la pression artérielle ainsi que de l'équilibre hydrosodé de l'organisme, principalement par ses effets rénaux. Il participe aussi à la régulation de la vasomotricité et au remodelage tissulaire dans le système cardio-vasculaire [13]. Les différents composants du SRA jouent un rôle important dans l'embryogenèse et le développement des organes, notamment des reins [14]. À l'âge adulte, de nombreux tissus expriment tout ou partie des composants du SRA, au premier rang desquels les reins mais aussi le foie, le pancréas, le cœur, les poumons et le cerveau [13].

Produite par le foie, l'angiotensinogène est transformé sous l'effet de la rénine en angiotensine-1. L'enzyme de conversion vient alors rapidement transformer l'angiotensine-1 en Ang-II, qui peut alors agir sur ses cellules cibles par l'intermédiaire principalement de 2 types de récepteur : le récepteur de type 1 (AT1-R), et le récepteur de type 2 (AT2-R) de l'angiotensine (Fig. 1). C'est lors de ces étapes de transformations enzymatiques que viennent agir les différentes thérapies inhibitrices du SRA : inhibiteurs de la rénine, de l'enzyme de conversion (IEC) ou les antagonistes des récepteurs de l'Ang-II (ARA-2).

AT1-R et AT2-R : les récepteurs de l'Ang-II

Ces 2 récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 segments transmembranaires. Après fixation de l'Ang-II, ils s'homodimérisent pour exercer leurs actions physiologiques : libération de l'aldostérone, vasoconstriction et régulation de l'équilibre hydrosodé [15] (Fig. 1).

Dans le même temps, AT1-R est phosphorylé, internalisé puis dégradé, pouvant ainsi activer plusieurs voies de signalisation liées aux tyrosines kinases : Erk, MAPK et jun-K et ainsi induire les remodelages rénaux et cardio-vasculaires [16]. Enfin, AT1-R semble pouvoir transactiver certains récepteurs de croissance comme l'EGF-R, comme décrit dans l'hypertrophie cardiaque [17].

AT2-R utilise pour sa part des voies de signalisation différentes en faisant intervenir les phosphatases, la GMP cyclique et la phospholipase-A2. Il diminue alors la pression artérielle par augmentation de la synthèse d'oxyde nitrique et augmentation de la natriurèse, mais diminue également la prolifération cellulaire tout en augmentant l'apoptose et la différenciation cellulaire [1,18].

Dans de nombreux types de cancers (sein, estomac, vessie, astrocytome, glioblastome, ovaire, utérus, spino-cellulaire, pancréas, rein, prostate, surrénale) une forte concentration d'AT1-R a pu être retrouvée dans les tissus tumoraux, démontrant ainsi un lien entre agressivité tumorale (tumeurs de stade et de grade élevés) et niveau d'expression de ce récepteur [1]. La surexpression d'AT2-R n'est observée que dans certaines tumeurs agressives telles que le glioblastome [19], le carcinome rénal à cellules claires [20] ou les cancers gastriques [21].

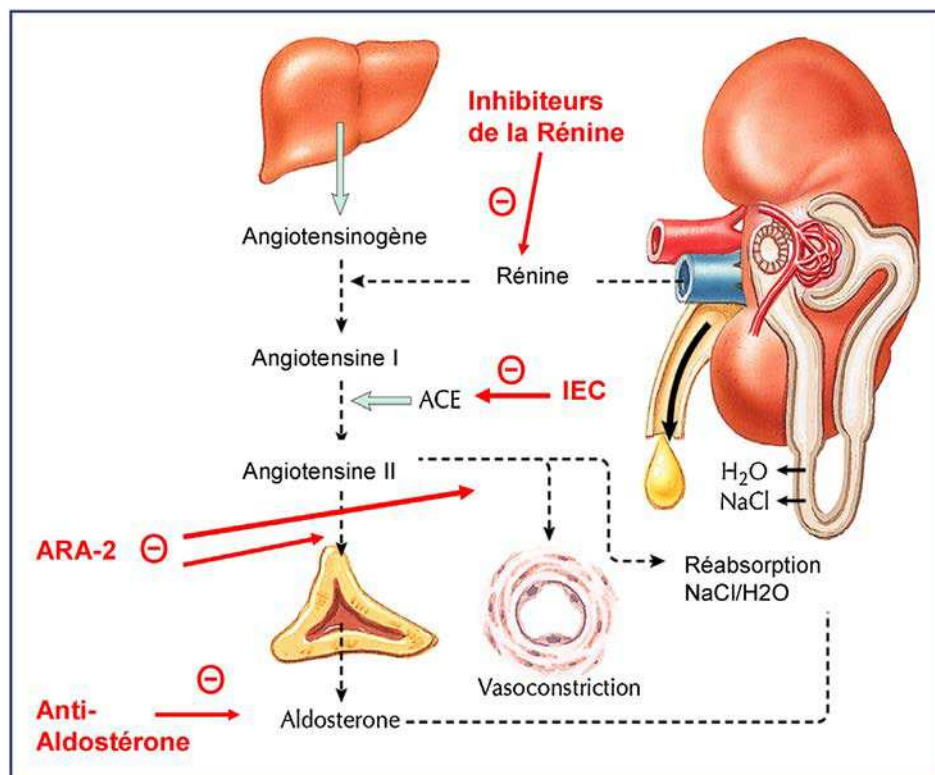


Figure 1. Système rénine-angiotensine et classes thérapeutiques bloquant la cascade enzymatique.

Rôle des récepteurs de l'Ang-II dans la carcinogenèse

De nombreux modèles cellulaires ou animaux ont apporté la preuve de l'implication de l'Ang-II dans les mécanismes de progression tumorale. Ce rôle est essentiellement médié par l'activation d'AT1-R.

Mécanismes d'action

Essentiel à la néovascularisation au sein de la tumeur et à la croissance tumorale, l'Ang-II est capable d'induire l'expression du VEGF-A et ainsi favoriser la néoangiogenèse au sein de nombreuses tumeurs [22,23] (Fig. 2). L'Ang-II est également impliquée dans la prolifération cellulaire via l'activation de plusieurs cascades moléculaires : la voie PI3-kinase/Akt [24], NF- κ B (nuclear factor- κ B) [25], PAX2 (paired homeobox 2), STAT3 (signal transducer and

activator of transcription 3) et JAK (jun activating kinase) [26]. Il a également été démontré une implication de la voie de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) dans différents modèles cellulaires endothéliaux, après transactivation du récepteur par AT1-R et Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinases) [27–29]. Enfin, l'Ang-II est capable d'inhiber certaines voies de l'apoptose via AT1-R [24], notamment en augmentant la survivine et en supprimant l'activité de la caspase-3 via l'activation de la voie PI3-kinase/Akt [30].

Modèles thérapeutiques expérimentaux

Ces constatations scientifiques dans différents types de cancers ont tout naturellement amené à vouloir tester les bloqueurs du SRA à visée anti-tumorale. Le blocage de la fixation de l'Ang-II à AT1-R par un antagoniste des récepteurs de type 1 à l'Ang-II (ARA-2) a ainsi été utilisé dans de nombreux modèles expérimentaux. Cette classe médicamenteuse de la famille des *Sartans* est un traitement déjà largement utilisé et connu dans la prise en charge de l'hypertension artérielle et de la protéinurie. L'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (IEC) a montré des propriétés anti-tumorales identiques, mais finalement peu de travaux l'ont étudié.

L'inhibition de la néoangiogenèse par diminution de la sécrétion de VEGF-A par les cellules tumorales est le principal mécanisme incriminé. In vitro, on constate une diminution de la production de VEGF-A sous l'action des ARA-2 [22,31,32]. Dans des modèles tumoraux chez la souris, l'utilisation des ARA-2 montre un net ralentissement de la croissance tumorale [33], ainsi que de la progression métastatique dans les cancers digestifs [34]. La prolifération cellulaire au sein de nombreuses tumeurs est également inhibée (mélanome, ostéosarcome, sein), via l'activation de la voie Erk1/2 associée à la transactivation de l'EGFR [35–37]. Parmi les autres mécanismes anti-tumoraux incriminés, il est décrit une diminution de la lymphoangiogenèse par les ARA-2 [38], une induction de l'apoptose [39] mais aussi une limitation de l'activation de la voie TGF- β dans un modèle murin de cancer du pancréas [40]. Enfin, l'utilisation d'ARA-2 comme des IEC semblent inhiber l'inflammation locale [41] et l'invasion tumorale locale [42].

Dans des modèles murins de xénogreffe, l'utilisation d'IEC dans le cancer du poumon potentialisait l'efficacité de la radiothérapie [43]. Ces effets bénéfiques ont aussi été constatés en association avec le 5-fluoro-uracil [44] ou l'interféron- β [45] dans l'hépatocarcinome, ainsi que dans un modèle animal de cancer du pancréas en association avec la gemcitabine [46], potentialisant les effets anti-tumoraux de ces différents traitements cytotoxiques. Finalement, dans un modèle de souris transgéniques, l'utilisation d'IEC permettait à la fois de ralentir la progression, mais aussi de prévenir la survenue d'un cancer du pancréas [47].

Le rôle d'AT2-R dans les mécanismes de tumorigenèse reste actuellement peu explicité. Il semblerait en effet qu'une spécificité d'action soit dépendante du type de cancer, avec un effet soit pro soit anti-oncogène [1]. À la différence d'AT1-R, seules quelques tumeurs agressives semblent exprimer AT2-R. Les résultats sont cependant à pondérer par le faible nombre de travaux réalisés sur ce

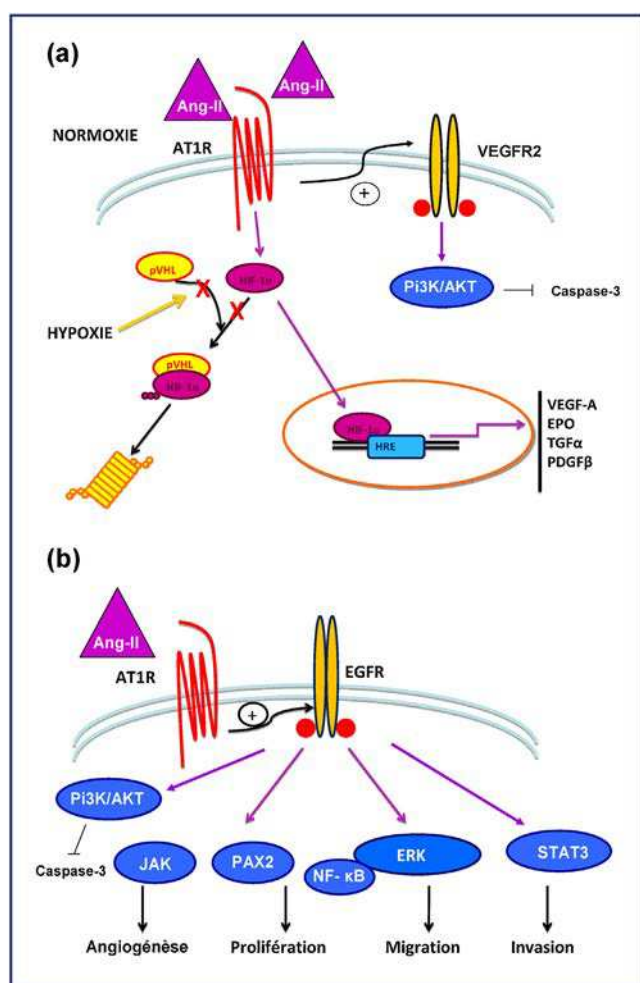


Figure 2. Rôle de l'Ang-II sur les différentes voies de signalisation liées à la prolifération et la migration cellulaire, ainsi que les voies de l'angiogenèse : a : la stimulation d'AT1R participe à la production de HIF-1 α , et augmente l'expression du VEGFR2 par transduction du signal ; b : AT1R transactive EGFR, induisant une stimulation des voies de la prolifération et de la migration cellulaire (ERK, PI3K-AKT, STAT3, JAK, PAX2), de l'angiogenèse (ERK, PI3K-AKT) et de l'inflammation (ERK, NF- κ B), tout en réduisant l'apoptose (caspase-3).

récepteur. L'interaction entre les 2 récepteurs transmembranaires reste d'autre part à définir.

Implication de l'Ang-II dans les cancers urologiques

L'implication du SRA et de l'Ang-II a été étudiée dans de nombreux cancers. Dans le domaine plus spécifique de l'urologie, plusieurs travaux ont également pu démontrer leur rôle potentiel dans la carcinogenèse. Il est également licite de se demander s'il existe un lien avec les carcinomes à cellules rénales, puisque les reins sont les effecteurs principaux du SRA et sont les organes qui expriment le plus fortement à l'état physiologique les récepteurs à l'Ang-II.

Dans le cancer de prostate

Il a été en effet constaté en PCR quantitative une surexpression de l'ARN messager d'AT1-R de patients atteints de cancer de prostate, comparativement au niveau d'expression dans du tissu prostatique non cancéreux. AT1-R transactivait alors le récepteur à l'EGF, conduisant à une activation de la voie Erk [29]. Ceci est d'autant plus intéressant que l'amplification de l'EGFR est fréquemment associée à la progression tumorale et que des stratégies thérapeutiques comme l'Herceptine® (trastuzumab) utilisée dans le cancer du sein et ciblant spécifiquement l'EGFR ont été développés [48]. D'autres voies moléculaires ont également été explorées, et l'Ang-II était capable d'induire la surexpression de PAX2 impliqué dans la croissance tumorale. L'utilisation alors d'un ARA-2 entraînait un blocage de cette voie [26]. Enfin la surexpression d'AT2-R induisait une apoptose via la caspase-3, indépendamment du niveau d'expression de l'Ang-II [49].

Dans un modèle cellulaire de cancer de prostate résistant à la castration, AT1-R se trouvait surexprimé entraînant une surexpression de HIF-1 α et de Ets-1 dans le noyau [50]. Le blocage par un ARA-2 in vivo engendrait alors une suppression de l'expression du VEGF, du taux de PSA dans le sang ainsi que de la croissance tumorale chez la souris castrée [51]. Dans d'autres travaux utilisant un modèle murin de xénogreffe, l'administration de candesartan entraînait de façon identique un ralentissement de la croissance tumorale ainsi que de l'angiogenèse [29].

Une seule étude clinique prospective pilote non contrôlée a été réalisée chez 23 patients présentant un cancer de prostate résistant à la castration. L'association de candesartan à un blocage androgénique complet permettait une discrète amélioration des symptômes douloureux ainsi qu'une diminution du taux de PSA [52]. Face à ces constatations, d'autres études cliniques mériteraient d'être réalisées pour en déterminer l'impact.

Dans le cancer de vessie

Peu de travaux portent actuellement sur le lien entre cancers de vessie et SRA. Tous ont été réalisés par la même équipe. L'étude sur un modèle cellulaire de tumeur vésicale humaine traité par candesartan a montré une sous-expression de l'expression du VEGF et de l'interleukine-8 en IHC, mais sans engendrer de toxicité directe. Cette constatation in vitro était confirmée sur un modèle animal, avec un ralentissement de la croissance tumorale et de la densité

microvasculaire chez les souris traitées [53]. La combinaison d'un ARA-2 à un traitement comme le paclitaxel ou le cis-dichlorodiammineplatine, utilisés communément dans le traitement des cancers de vessie, potentialisait alors les effets du traitement cytotoxique en inhibant l'angiogenèse et en induisant plus d'apoptose [23,54].

Dans le cancer du rein

Jusqu'à présent, de nombreuses voies de signalisation ont pu être explorées dans le cancer du rein, avec pour conséquence le développement de thérapies ciblées [55]. Malgré tout, de nouvelles approches sont envisagées et l'impact d'autres voies moléculaires comme celle du SRA sont étudiées [11].

Dans un modèle de xénogreffe de cancer du rein, on pouvait ainsi observer que la prise d'IEC entraînait une réduction de la taille tumorale [56]. De la même façon, la prise d'ARA-2 diminuait le développement et le nombre de métastases pulmonaires, mais réduisait également la concentration de VEGF circulant comme le nombre de néovaisseaux dans les localisations secondaires chez la souris [57]. Enfin dans notre modèle animal expérimental de carcinome à cellules claires, la croissance tumorale était ralentie par un traitement associant du sunitinib à un ARA-2, comparativement au sunitinib ou à l'ARA-2 pris de manière isolée. L'association des 2 traitements engendrait plus de nécrose, et une réduction significative de la vascularisation centrale de la tumeur [58].

Chez l'homme, nous avons pu démontrer dans une série rétrospective de 84 patients opérés d'un cancer du rein, un lien entre agressivité tumorale et niveau d'expression d'AT1-R. Son niveau d'expression déterminé par immunohistochimie comme par Western Blot était alors significativement augmentée pour les tumeurs de grade Fuhrman 4. Cette surexpression était corrélée à la survie sans progression des patients [20]. Une autre étude a été réalisée chez 127 patients traités par inhibiteurs de tyrosine kinases pour un carcinome rénal à cellules claires métastatique entre 2004 et 2010. Les auteurs ont ainsi comparé 44 patients ayant reçu un IEC ou un ARA-2, avec 83 patients n'ayant reçu aucune de ces 2 classes thérapeutiques. Ceux traités par un bloqueur du SRA présentaient alors une meilleure réponse au traitement anti-angiogénique et avaient une survie sans progression significativement améliorée [10]. Dans le cancer du rein, la pertinence de cette association est renforcée par le fait que les ARA-2 sont capables d'inhiber la sécrétion de VEGF, principale cible des inhibiteurs de tyrosines kinases, mais aussi la voie de l'EGF [59].

Conclusion

De nombreuses données expérimentales et cliniques ont démontré une implication de la voie rénine-angiotensine dans la carcinogenèse. Un effet anti-tumoral des bloqueurs du SRA semble mis en évidence, surtout s'ils sont utilisés en complément des traitements anti-cancéreux conventionnels. À l'heure actuelle, aucun essai clinique prospectif combinant bloqueurs du SRA aux différentes thérapies anti-tumorales n'a été conduit

pour en déterminer l'impact. Cette question mérite cependant d'être posée au vu des nombreuses données publiées jusqu'à présent.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Région Bretagne, université Rennes 1, Fonds de recherche de l'Association française d'urologie pour leur soutien financier.

Références

- [1] Dolley-Hitze T, Verhoest G, Jouan F, Le Pogamp P, Arlot-Bonnemains Y, Oger E, et al. Récepteurs de type 1 à l'angiotensine-2 (AT1R) et cancers. *Nephrol Ther* 2013;9:85–91.
- [2] Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY, Simon DI, Fang JC. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2010;11:627–36.
- [3] Sipahi I, Chou J, Mishra P, Debanne SM, Simon DI, Fang JC. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cancer risk. *Am J Cardiol* 2011;108:294–301.
- [4] ARB Trialists Collaboration. Effects of telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, and losartan on cancers in 15 trials enrolling 138,769 individuals. *J Hypertens* 2011;29:623–35.
- [5] Meredith PA, McInnes GT. Angiotensin-receptor blockade, cancer, and concerns. *Lancet Oncol* 2010;11:819.
- [6] Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998;352:179–84.
- [7] Huang CC, Chan WL, Chen YC, Chen TJ, Lin SJ, Chen JW, et al. Angiotensin II receptor blockers and risk of cancer in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 2011;107:1028–33.
- [8] Wilop S, von Hobe S, Crysandt M, Esser A, Osieka R, Jost E. Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1429–35.
- [9] Chae YK, Valsecchi ME, Kim J, Bianchi AL, Khemasuwan D, Desai A, et al. Reduced risk of breast cancer recurrence in patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins. *Cancer Invest* 2011;29:585–93.
- [10] Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *Eur J Cancer* 2011;47:1955–61.
- [11] Neuzillet Y, Delbado C. Les voies anti-angiogéniques du futur. *Prog Urol* 2011;21(Suppl 2):S13–5.
- [12] Ravaut A. Le mécanisme de l'angiogenèse tumorale. *Prog Urol* 2007;17(1 Suppl. 1):144–7.
- [13] George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;10:745–59.
- [14] Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol* 1997;272:R662–8.
- [15] Oro C, Qian H, Thomas WG. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 2007;113:210–26.
- [16] Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006;20:953–70.
- [17] Smith NJ, Chan HW, Osborne JE, Thomas WG, Hannan RD. Hijacking epidermal growth factor receptors by angiotensin II: new possibilities for understanding and treating cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2695–703.
- [18] Suzuki K, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Nakatsue T, Fujioka Y, et al. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors play opposite roles in regulating the barrier function of kidney glomerular capillary wall. *Am J Pathol* 2007;170:1841–53.
- [19] Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, et al. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 2008;99:160–6.
- [20] Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer* 2010;103:1698–705.
- [21] Rocken C, Rohl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al. The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1206–12.
- [22] Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA, et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling. *J Gastrointest Surg* 2008;12:57–66.
- [23] Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Horiguchi Y, Murai M. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on tumor growth and angiogenesis in a xenograft model of human bladder cancer. *Hum Cell* 2007;20:1–9.
- [24] Zhao Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Fu S. Angiotensin II/angiotensin II type I receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway. *J Cell Physiol* 2010;225:168–73.
- [25] Kinoshita J, Fushida S, Harada S, Yagi Y, Fujita H, Kinami S, et al. Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin. *Int J Oncol* 2009;34:1573–82.
- [26] Bose SK, Gibson W, Giri S, Nath N, Donald CD. Angiotensin II up-regulates PAX2 oncogene expression and activity in prostate cancer via the angiotensin II type I receptor. *Prostate* 2009;69:1334–42.
- [27] Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, et al. Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiotensin II and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 2001;88:22–9.
- [28] Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, et al. Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2003;196:370–7.
- [29] Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows anti-proliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1139–47.

- [30] Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res* 2004;94:785–93.
- [31] Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, et al. Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109:418–25.
- [32] Arafat HA, Gong Q, Chipitsyna G, Rizvi A, Saa CT, Yeo CJ. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 2007;204:996–1005.
- [33] Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF. Angiotensin II, type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci* 2008;53:1206–10.
- [34] Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer* 2010;10:134.
- [35] Wasa J, Sugiura H, Kozawa E, Kohyama K, Yamada K, Taguchi O. The tumor suppressive effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist in a murine osteosarcoma model. *Anticancer Res* 2011;31:123–7.
- [36] Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CM, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:79–87.
- [37] Du N, Feng J, Hu LJ, Sun X, Sun HB, Zhao Y, et al. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep* 2012;27:1893–903.
- [38] Wang L, Cai SR, Zhang CH, He YL, Zhan WH, Wu H, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:2167–71.
- [39] Gong Q, Davis M, Chipitsyna G, Yeo CJ, Arafat HA. Blocking angiotensin II Type 1 receptor triggers apoptotic cell death in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2010;39:581–94.
- [40] Arnold SA, Rivera LB, Carbon JG, Toombs JE, Chang CL, Bradshaw AD, et al. Losartan slows pancreatic tumor progression and extends survival of SPARC-null mice by abrogating aberrant TGFbeta activation. *PLoS One* 2012;7:e31384.
- [41] Chehl N, Gong Q, Chipitsyna G, Aziz T, Yeo CJ, Arafat HA, et al. Angiotensin II regulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in pancreatic cancer cells. *J Gastrointest Surg* 2009;13:2189–200.
- [42] Spychalowicz A, Wilk G, Sliwa T, Ludew D, Guzik TJ. Novel therapeutic approaches in limiting oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:2456–66.
- [43] Kohl RR, Kolozsvary A, Brown SL, Zhu G, Kim JH. Differential radiation effect in tumor and normal tissue after treatment with ramipril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Radiat Res* 2007;168:440–5.
- [44] Yanase K, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kitade M, Kaji K, et al. Synergistic inhibition of hepatocellular carcinoma growth and hepatocarcinogenesis by combination of 5-fluorouracil and angiotensin-converting enzyme inhibitor via anti-angiogenic activities. *Oncol Rep* 2007;17:441–6.
- [45] Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, et al. Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9:6038–45.
- [46] Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, et al. Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities. *Oncol Rep* 2009;22:355–60.
- [47] Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2010;59:630–7.
- [48] Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:293–9.
- [49] Li H, Qi Y, Li C, Braseth LN, Gao Y, Shabashvili AE, et al. Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:3255–65.
- [50] Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, Kikuchi E, Hasegawa M, Mikami S, et al. Ets-1 and hypoxia inducible factor-1alpha inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer. *Prostate* 2010;70:162–9.
- [51] Kosaka T, Miyajima A, Takayama E, Kikuchi E, Nakashima J, Ohigashi T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate* 2007;67:41–9.
- [52] Uemura H, Hasumi H, Kawahara T, Sugiura S, Miyoshi Y, Nakai-gawa N, et al. Pilot study of angiotensin II receptor blocker in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Int J Clin Oncol* 2005;10:405–10.
- [53] Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M. Angiotensin II, type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:2888–93.
- [54] Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Horiguchi Y, Murai M, et al. Angiotensin II, type 1 receptor antagonist enhances cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity in mouse xenograft model of bladder cancer. *Urology* 2009;73:655–60.
- [55] Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Patard JJ. Voies moléculaires de l'angiogenèse tumorale et nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans le cancer du rein. *Prog Urol* 2005;15:1021–9.
- [56] Hii SI, Nicol DL, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1998;77:880–3.
- [57] Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II, type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002;62:4176–9.
- [58] Verhoest G, Dolley-Hitze T, Jouan F, Bensalah K, Belaud-Rotureau MA, Rioux-Leclercq N, et al. Efficacité des antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II en association aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans un modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires. *Prog Urol* 2011;21:732–4.
- [59] Becker BN, Kondo S, Chen JK, Harris RC. Tyrosine kinase inhibition affects type 1 angiotensin II receptor internalization. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:975–93.

Objectifs

Au regard des données publiées dans la littérature, le SRA semble donc directement ou indirectement impliqué dans la croissance et la progression tumorale. De plus, les ccRCC se développent à partir des cellules tubulaires contournées proximales qui elles-mêmes expriment les récepteurs à l'angiotensine-II. Les TKI ont par ailleurs de nombreux effets secondaires, et peuvent notamment engendrer ou aggraver une hypertension artérielle, amenant parfois à devoir réduire la posologie du traitement anti-cancéreux voire à le stopper. Toutes ces données scientifiques sur le rôle protecteur et potentialisateur des ARA-2 nous ont fait nous intéresser à son efficacité possible dans le ccRCC.

Notre hypothèse est donc que le blocage des récepteurs de type 1 de l'angiotensine-II par l'utilisation d'ARA-2 pourrait potentialiser l'action des TKI et permettre de diminuer leur toxicité notamment cardio-vasculaire.

L'objectif de cette thèse est donc double :

- Mettre aux points différents modèles murins de xénotransplantation de carcinomes rénaux à cellules claires, à partir de lignées commerciales et de lignées primaires issues de patients.
- Tester sur ces modèles animaux l'association des ARA-2 (Telmisartan) au sunitinib, et ainsi déterminer le potentiel rôle adjuvant de ces 2 traitements dans la carcinologie rénale.

Résultats

Le sunitinib en association avec les antagonistes des récepteurs de type 1 à l'angiotensine-II induit plus de nécrose: modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires.

“Sunitinib combined to angiotensin-2 type-1 receptor antagonists induces more necrosis: a murine xenograft model of renal cell carcinoma.”

Dans cette 1ère partie de thèse, un modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires a été mis au point, en utilisant une lignée commerciale (786-O) issue d'un homme âgé de 56 ans (Human commercial ccRCC cells lines – ATCC, USA).

Cette lignée a été analysée en immunofluorescence, et exprime le récepteur AT1-R.

Le caryotype des 786-O montrent une délétion du bras court du chromosome 3 (porteur du gène *VHL*), ainsi qu'une perte des chromosomes 4, 14, et du bras court du chromosome 9 qui sont des facteurs de mauvais pronostic reconnus dans la littérature⁸⁵.

Des souris tests ont été injectées ensuite avec 10 millions de cellules tumorales 786-O en sous-cutané dans le flanc. La mise au point du modèle a permis de développer des tumeurs en 5 semaines chez des souris *Balb b/c nude*, avec une moyenne tumorale de 200 mm³.

L'étape suivante a consisté à injecter 40 souris *nude*, de les diviser en 4 groupes, puis de tester notre hypothèse de potentialisation du sunitinib par le telmisartan (ARA-2) sur un cycle de traitement de 4 semaines. Dans un 1^{er} groupe, 10 souris recevaient le sunitinib seul, dans le 2^{ème} groupe le telmisartan seul, un 3^{ème} groupe recevait l'association de ces 2 traitements, et enfin le dernier groupe recevait un placebo (le diluant utilisé pour les drogues : le DMSO). A

l'issu de cette période, les animaux étaient sacrifiés. Le sang et la tumeur étaient prélevés pour analyse biologique (ELISA), histologique (IHC), et protéique (Western Blot).

La méthodologie et les résultats sont présentés dans l'article qui suit, actuellement sous presse dans la revue *Biomed Research International*. Il en ressort que l'association des 2 traitements engendrait un ralentissement de la croissance tumorale mais de manière non significative ($p=0,06$), plus de nécrose tumorale ($p=0,038$), une réduction de la densité microvasculaire centrale ($p=0,038$), et une réduction du VEGF circulant. En revanche, aucune différence n'était notée concernant la prolifération tumorale et l'apoptose tumorale en analyse IHC comme en Western blot.

Research Article

Sunitinib Combined with Angiotensin-2 Type-1 Receptor Antagonists Induces More Necrosis: A Murine Xenograft Model of Renal Cell Carcinoma

Grégory Verhoest,^{1,2,3} Thibault Dolley-Hitze,^{1,4} Florence Jouan,¹
Marc-Antoine Belaud-Rotureau,^{1,5,6} Emmanuel Oger,^{6,7,8} Audrey Lavenu,^{6,8}
Karim Bensalah,^{2,6} Yannick Arlot-Bonnemains,^{1,6} Nicolas Collet,⁹
Nathalie Rioux-Leclercq,^{1,6,10} and Cécile Vigneau^{1,4,6}

¹ CNRS/UMR 6290/Biosit, Rennes 1 University, 35043 Rennes Cedex, France

² CHU Rennes, Department of Urology, 35033 Rennes, France

³ Rennes University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex, France

⁴ CHU Rennes, Department of Nephrology, 35033 Rennes, France

⁵ CHU Rennes, Department of Cytogenetics, 35033 Rennes, France

⁶ Rennes 1 University, 35043 Rennes, France

⁷ CHU Rennes, Department of Clinical Pharmacology, 35033 Rennes, France

⁸ INSERM/Pharmacoepidemiology Team/CIC0203/Biosit, Rennes 1 University, 35043 Rennes, France

⁹ CHU Rennes, Department of Biochemistry, 35033 Rennes, France

¹⁰ CHU Rennes, Department of Pathology, 35033 Rennes, France

Correspondence should be addressed to Grégory Verhoest; gregory.verhoest@chu-rennes.fr

Received 27 February 2014; Accepted 25 April 2014; Published 22 May 2014

Academic Editor: Irfan A. Asangani

Copyright © 2014 Grégory Verhoest et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Angiotensin-2 type-1 receptor antagonists not only are antihypertensive drugs but also can inhibit VEGF production. We hypothesised that adding telmisartan to sunitinib could potentiate the antiangiogenic effects. **Material and Methods.** 786-O cell lines were injected in nude mice. After tumor development, mice were divided into 4 groups: the first was the control group (DMSO), the second group was treated with sunitinib alone, the third group was treated with telmisartan alone, and the fourth group was treated with the combination. Drugs were orally administered every day for four weeks. Animals were sacrificed after treatment. Blood and tumor tissues were collected for analysis by immunohistochemistry, Western Blot, and ELISA methods. **Results.** All animals developed a ccRCC and ten in each group were treated. Using a kinetic model, tumors tended to grow slower in the combination group compared to others ($P = 0.06$). Compared to sunitinib alone, the addition of telmisartan significantly increased tissue necrosis ($P = 0.038$). Central microvascular density decreased ($P = 0.0038$) as well as circulating VEGF ($P = 0.003$). There was no significant variation in proliferation or apoptosis markers. **Conclusion.** The combination of sunitinib and telmisartan revealed an enhancement of the blockage of the VEGF pathway on renal tumor resulting in a decrease in neoangiogenesis and an increase in necrosis.

1. Introduction

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) represents almost 70% of renal cancers and 3% of malignant tumours in adults. Distant metastases are present in 20% of the cases, and 30%

of the patients will develop metastases during their natural history [1]. One of the bad prognostic factors for this tumour is a high vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration, which stimulates neoangiogenesis [2]. During the last years, new antiangiogenic treatments targeting tyrosine

kinase receptors like VEGF receptors have improved patients' survival [3, 4]. Nevertheless, many patients are likely to develop cardiac (hypertension or cardiac failure) or renal side effects (proteinuria and thrombotic microangiopathy), compelling them to reduce or stop these treatments. However, hypertension development could predict a good response to antiangiogenic therapies [5, 6].

Angiotensin II is the active peptide of the Renin-Angiotensin System (RAS). It is a major regulator of blood pressure and cardiovascular homeostasis. Its biological effects are mainly mediated through two types of receptors: AT1-R and AT2-R, and most physiological effects have been attributed to AT1-R stimulation. Angiotensin II has been shown to play a role in different pathological situations involved in tissue remodelling like cardiac hypertrophy, development, or wound healing and also in cancers [7].

In addition, several experimental models recently suggested that angiotensin II could be involved in cancer development and progression [8, 9] and that RAS blockage by AT1-R antagonists or Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE-Is) could be useful in cancer therapy [10]. We therefore hypothesized that such combination could be tested in ccRCC so that AT1-R antagonists could potentiate the effects of tyrosine kinase inhibitors. We also recently demonstrated that AT1-R was overexpressed in ccRCC with high Fuhrman grade and that this overexpression was correlated to patients' survival [11]. The data lead us to suppose that AT1-R blockers could have antiangiogenic and/or antiproliferative and/or proapoptotic properties in ccRCC treatment.

The objective of this study was to evaluate the impact of one AT1-R blocker, telmisartan, alone or in combination with one tyrosine kinase inhibitor (TKI), sunitinib, on ccRCC from a macroscopic to a biological perspective.

2. Material and Methods

2.1. Materials. Sunitinib was generously supplied by Pfizer (SU-1128 AKA PF-2783926-41, Pfizer, USA). Telmisartan and DMSO were from Sigma-Aldrich, USA.

2.2. Murine Xenograft Model of ccRCC and Treatments. The scientific project got all permissions from an ethical committee, which had a full description of the project, to ensure minimum pain among the animals (Rennes University: R-2010-CV-01 and R-2011-CV-01). All mice were maintained according to the guide for the care and use of laboratory animals.

Forty female nude athymic BALB/c mice (Janvier Laboratory, France) between 6 and 8 weeks were injected with 10^7 cells 786-O (Human commercial ccRCC cells lines, ATCC, USA) subcutaneously in the left flank as previously described [12].

Mice were weighed and blood pressure was measured by a plethysmographic and noninvasive device (CODA STANDARD MONITOR, Emka Technologies, USA) once a week and also during all of the duration of the experiment. The growth of tumor xenografts was monitored once a week by caliper measurement of length (*a*), width (*b*), and thickness

(*c*). Tumor volumes were calculated using the formula $(a \times b \times c) \times 0.5236$.

Five weeks after tumor cell injection, mice were divided into 4 groups of 10 mice according to the following plan: the first group comprising 10 untreated mice used as a control group (DMSO, injection), the second group was composed of 10 mice treated with sunitinib alone (40 mg/kg/d), the third group included 10 mice treated with ARA-2 alone (telmisartan 5 mg/kg/d), and the fourth consisted of 10 mice treated with the combination of sunitinib (40 mg/kg/d) and ARA-2 (telmisartan 5 mg/kg/d). Sunitinib or telmisartan powders were dissolved in pure DMSO, then diluted in a 1% water solution, and sonicated. Previous studies showed that the bioavailability and the metabolism of sunitinib were similar for mouse and human allowing us to treat mice with 40 mg/kg/d [13]. Telmisartan was delivered at 5 mg/kg/d according to previous studies [14]. At the end of the 4-week treatments, mice were anesthetized 24 hours after the last drug administration with a solution of ketamine (Imalgene 1000, Merial, France) and xylazine 2% (Rampun 2%, Bayer, Germany) administered subcutaneously in thigh. Blood was immediately removed by intracardiac puncture. Serum was frozen at -80°C for further analysis after blood clotting and 8000 g centrifugation. Tumors were harvested and kept for analysis. Tumor tissues were divided into two equal parts, frozen in liquid nitrogen or fixed in a 10% formaldehyde solution, and embedded in paraffin.

2.3. Immunofluorescence (IF). Blocking has been performed with immunofluorescence buffer (PBS, 3% BSA, 0.2% Triton 100x) for 1h followed by 15min incubation with a second immunofluorescence buffer (PBS, 1% BSA, 0.06% Triton 100x). Primary antibody against AT1R (1: 100, Rabbit, (N-10): sc-1173, Santa-Cruz Biotechnology, USA) has been incubated for 2h at room temperature in a humidified chamber. After washing, cells have been incubated with Alexa-Fluor 546 goat anti-Rabbit Ig G (H + L), (1: 5000, Molecular Probes, USA) for 2 hours. The nuclei were counterstained with DAPI/Antifade (Q-Biogene, MP Biomedicals, USA). Samples were analyzed with fluorescence microscope system (LEICA DMRXA, Germany).

2.4. Histology and Immunohistochemistry (IHC). Histological examination was performed on 5 μm formalin-fixed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin safran. All specimens have been examined blindly by a single pathologist (NRL).

The IHC experiments were realized on 5 μm tumour sections which were incubated at room temperature for 1h with primary antibodies against KI67 (1: 100, monoclonal rabbit antibody, clone SP6, Interchim, France), CD31 (1: 50, rat monoclonal antibody, clone SZ 31, Dianova, Germany), and VEGF-A (1: 100, rabbit polyclonal antibody, clone Ab-4, Calbiochem, USA). Immunostaining was performed using BenchMark XT-Ventana Medical Systems with kit DABMAP (using streptavidin/biotin system) for CD31 or kit OMN-IMAP (system "biotin-free" using multimer technology) for KI67 and VEGF with antigen retrieval for all (citrate buffer

pH 6.0; Tris/Borate/EDTA pH 8.0). In order to detect apoptotic cells, tumors were stained with antiactivated caspase-3 primary antibody (1: 500, monoclonal mouse antibody, clone 3G2, Cell Signaling Technology, USA). Tissues have been blocked for 15 min and then incubated with primary antibody overnight at 4°C, and the incubation with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Envision + Dual Link System-HRP, Dako, Denmark). Revelation was performed with the diaminobenzidine chromogen (Dako, Denmark). Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Immunoreactivity of VEGF-A, KI67, and activated caspase-3 was expressed as the percentage of positive cells by scoring 500 cells. MicroVascular Density (MVD), expressed as the number of vessel sections per mm², was determined by analyses of 10 representative fields accounting for 2 mm². To perform the analysis of tumor necrosis, glass slides were converted to digital slides with the scanner Nanozoomer 2.0-RS Hamamatsu. We used the NDP viewer Hamamatsu to determine the percentage of necrosis by measurement of tumor area and necrosis, respectively. The way is to draw a freehand region around the tissue of interest to obtain an automatic area measurement.

2.5. Measurement of VEGF by ELISA. VEGF concentrations of the murine serum were determined by ELISA method in accordance with supplier's instructions (Quantikine kit, RnD, USA).

2.6. Western Blot Analysis. Protein extracts were prepared from frozen tumor tissues. Thin cuts of tissues were done before homogenisation in mRIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 1mM EDTA, 1mM sodium fluoride, 1 mM AEBSF, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, and 1mM sodium orthovanadate). Extracts were centrifuged at 10,000 rpm for 10min and centrifuged during 30 min at 4°C. Fifty µg of each extract was electrophoresed on a 15% polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes washed with TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) have been saturated with 5% low fat milk in TBST for 2 h at room temperature and then incubated with primary antibodies in 2.5% low fat milk in TBST at 4°C overnight, followed by an incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (1: 50 000 in TBST-BSA 2.5% for 1h at RT). All the protein extracts were frozen at -80°C before blotting.

Antibodies against p44/42 MAP kinase (Erk1/2) (1: 2000, polyclonal rabbit antibody, Cell Signaling, USA), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr 02/Tyr204) (1: 1000, monoclonal mouse antibody, E10 clone, Cell Signaling, USA), AKT (1: 500, polyclonal rabbit antibody, 9272, Cell Signaling, USA), phospho-AKT (Ser 473) (1: 1000, polyclonal rabbit antibody, Cell Signaling), phospho-VEGFR2/KDR/flk-1 (Y1214) (1: 1000, polyclonal rabbit antibody, RnD Systems, USA), and PARP (1: 500, monoclonal rabbit antibody, 46D11 clone, Cell Signaling, USA) were incubated overnight at 4°C, and then horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1: 10000, Jackson Immuno-Research laboratories,

Baltimore, MD) that specifically bind to the primary antibody were used. The blots were then disclosed with a chemiluminescent detection system (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce Biotechnology, USA) which can be visualised on X-ray film (Tabletop processor, CURIX 60, AGFA HealthCare, Belgium).

2.7. MTT Assay for Cell Viability. The effect of the sunitinib, telmisartan, or combined association on cell proliferation was assayed in sterile 96-well microtiter tissue plates (Becton Dickinson, Oxnard, USA). The 786-O cells were seeded at 2.5×10^4 cells/mL of medium (100 µL per well). The different compounds (10 µL per well) at the appropriate concentration (10 nM–1 mM) were added after 24 hours of cell culture. Incubations were performed at 37°C during 72 h. After exposure to the compounds, cell growth was determined by measuring the formazan formation from 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). Multiskan MCC/340 microplate reader (LabSystems, Israel) was used for absorbance measurements (570 nm). Viability was determined by calculation of the ratio of optical density at J3/J0.

2.8. Statistical Analysis. Data are expressed as median. Comparison of continuous variables used nonparametric Kruskal-Wallis or Wilcoxon tests. For tumor growth, all individual data were analyzed simultaneously using nonlinear mixed effect models, which allow sharing information across subjects. Correlation between continuous variables was assessed by Spearman correlation. A probability (*P*) value of less than 0.05 was considered statistically significant for overall inter-group comparisons and two-by-two comparisons. Analyses were performed with SAS software version 9.2 (SAS Institute, USA).

3. Results

3.1. Cell Lines Express Angiotensin Type-1 Receptor. The expression of AT1R was revealed by Western Blot on 786-O cells and tumor tissues treated or not with sunitinib alone, telmisartan alone, or combination (Figure 1(a)). The presence of the receptor AT1-R was visualised onto the cell line 786-O cells by immunofluorescence (Figure 1(b)).

3.2. Mice and Tumor Development. Ten mice were treated in each group. Two animals died in the control group before the beginning of treatment. One mouse that belongs to the sunitinib group developed severe side effects as oedema, hypertension, and hepatomegaly and died 10 days after the beginning of treatment. Nevertheless, its tumor was harvested and analyzed. In addition, one mouse corresponding to the group treated with telmisartan did not develop any tumour. Consequently, 3 tumours were missing for the analysis.

During the follow-up, mice treated with sunitinib alone developed hypertension. Medium arterial pressure in the sunitinib group, 100.7 ± 21.8 mmHg, was significantly different from blood pressure in other groups, 85.3 ± 18.0 mmHg in control group, 77.0 ± 18.2 mmHg in the telmisartan group,

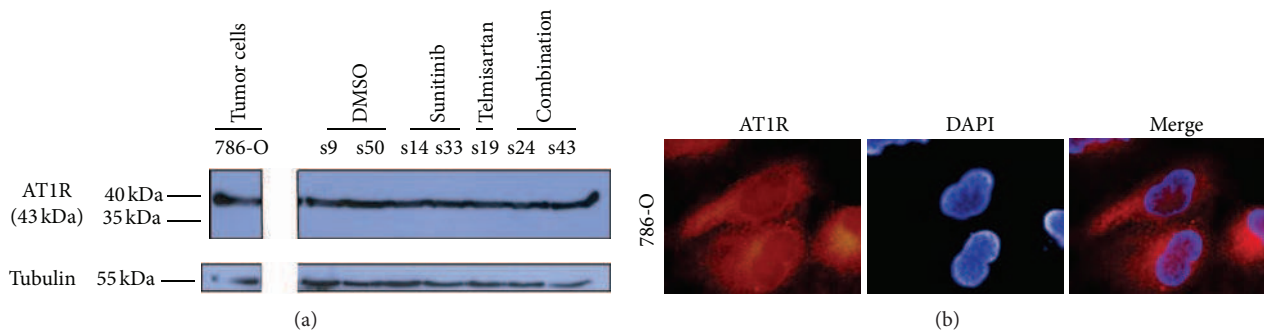


Figure 1: (a) Western Blot analysis of AT1R expression in 786-O cells and in different mice treated by either DMSO, sunitinib, telmisartan, or combined drugs. (b) Immunostaining of AT1R (red) and DAPI staining (blue) in 786-O cells. AT1-R stains for the membranes of tumour and endothelial cells ($\times 1000$).

and 70.8 ± 1.9 mmHg in the association group ($P = 0.0034$, Kruskal-Wallis test). The results confirm that drugs orally administered were well assimilated by animals leading to expected systemic effects on blood pressure.

Using a statistical kinetic model, tumors tended to grow slower in the combination group compared to other groups ($P = 0.06$) (Figures 2(a) and 2(b)—see Supplementary Data available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/901371>).

3.3. Combination of Telmisartan with Sunitinib Increases Tumour Necrosis. The histological analysis of tumors induced in mice revealed in all cases the development of a Fuhrman 4 ccRCC (Figure 3(a)(A)). HES staining also revealed the presence of necrosis area which was significantly more extensive when mice were treated with the combination of telmisartan and sunitinib ($P = 0.038$, Figures 3(a)(B) and 3(a)(C)). Indeed, necrosis in the combination group ($16.9\% \pm 12.8\%$) was significantly more important compared to the control group ($4.7\% \pm 3.4\%$ — $P = 0.0185$), the sunitinib group ($6.7\% \pm 4.1\%$ — $P = 0.0376$), or the telmisartan group ($6.7\% \pm 4.1\%$ — $P = 0.0373$). As a consequence, the quantity of viable tumour decreased in the combination group compared to the others ($P < 0.0001$).

3.4. Combination Inhibits Neovascularisation. As tumour necrosis increased in mice treated with the combination of drugs, we investigated tumour vascularisation. Microvascular density (MVD) was determined by CD31 staining for each tumour (Figure 4(a)). Drugs combined globally decreased MVD in the centre of tumors ($MVD = 3.8 \text{ vessels/mm}^2 \pm 2.4$ — $P = 0.0038$) as well as compared to control group ($10.6 \pm 5.6 \text{ vessels/mm}^2$ — $P = 0.0029$), sunitinib group ($7.7 \pm 3.6 \text{ vessels/mm}^2$ — $P = 0.0171$), and telmisartan group ($9.7 \pm 4.2 \text{ vessels/mm}^2$ — $P = 0.0036$) (Figure 4(b)). It was also observed that tumors with low MVD had more extensive necrosis (Spearman correlation coefficient is 0.45 — $P = 0.005$). In contrast to central vasculature, peripheral vasculature was not affected by drug regimen administered.

3.5. Combination Decreases VEGF-A Concentration in Mice Serum. As the drug administration affected tumor vascularisation, we wondered whether the concentration of circulating VEGF-A was altered. We evaluated the circulating

VEGF-A concentration by ELISA. The amount of VEGF-A significantly increased in the sunitinib group ($10022 \text{ pg/mL} \pm 12741 \text{ pg/mL}$) compared to the control group ($1010 \text{ pg/mL} \pm 606 \text{ pg/mL}$ — $P = 0.0045$), whereas there was no significant difference with the telmisartan group ($1172 \text{ pg/mL} \pm 112 \text{ pg/mL}$ — $P = 1.00$). When telmisartan was used in combination, the upraise of serum VEGF-A concentration induced by sunitinib was lower but not statistically significant ($2117 \text{ pg/mL} \pm 825 \text{ pg/mL}$ — $P = 0.141$, Figure 4(c)).

3.6. Combination Does Not Modify Tumour Proliferation or Apoptosis. The effect of combination of telmisartan and sunitinib was first tested on 786-O cell culture by MTT assay. The association did not modify the effect of sunitinib alone on cell proliferation (Figure 5(a)). Moreover, no variation of the ratio ERK1/2/P-ERK or AKT/p-AKT was registered in the assay (Figure 5(b)). The results indicate that association was not more toxic on 786-O cells than sunitinib alone.

Telmisartan as well as sunitinib is known to inhibit tumor cell proliferation and induce apoptosis on several tumours. The combination of sunitinib and telmisartan did not inhibit tumor cell proliferation, as well as each of them separately. The percentage of proliferative cells stained by KI67 was analyzed for each group and exhibited a high degree of expression: from 59% to 64% ($p = \text{ns}$ —Figure 6(a)). The expression of proteins involved in the proliferation and survival pathways was also analyzed by Western Blot (Figure 6(b)). Neither activated ERK pathway nor activated AKT pathway was modified in the case of treatment with the combination of telmisartan and sunitinib.

4. Discussion

In this work, we have shown that telmisartan potentiates the effects of sunitinib on renal cell carcinoma by increasing tumor necrosis. AT1-R blockers are widely used drugs. Several years ago, there have been many clinical trials on cardiovascular and renal endpoints, and no increased incidence of cancer has been usually reported as secondary endpoint or in post hoc analysis [15]. Despite those trials and many scientific studies on different types of cancers, there is still a controversy regarding antitumoral or protumoral effects of these treatments [16].

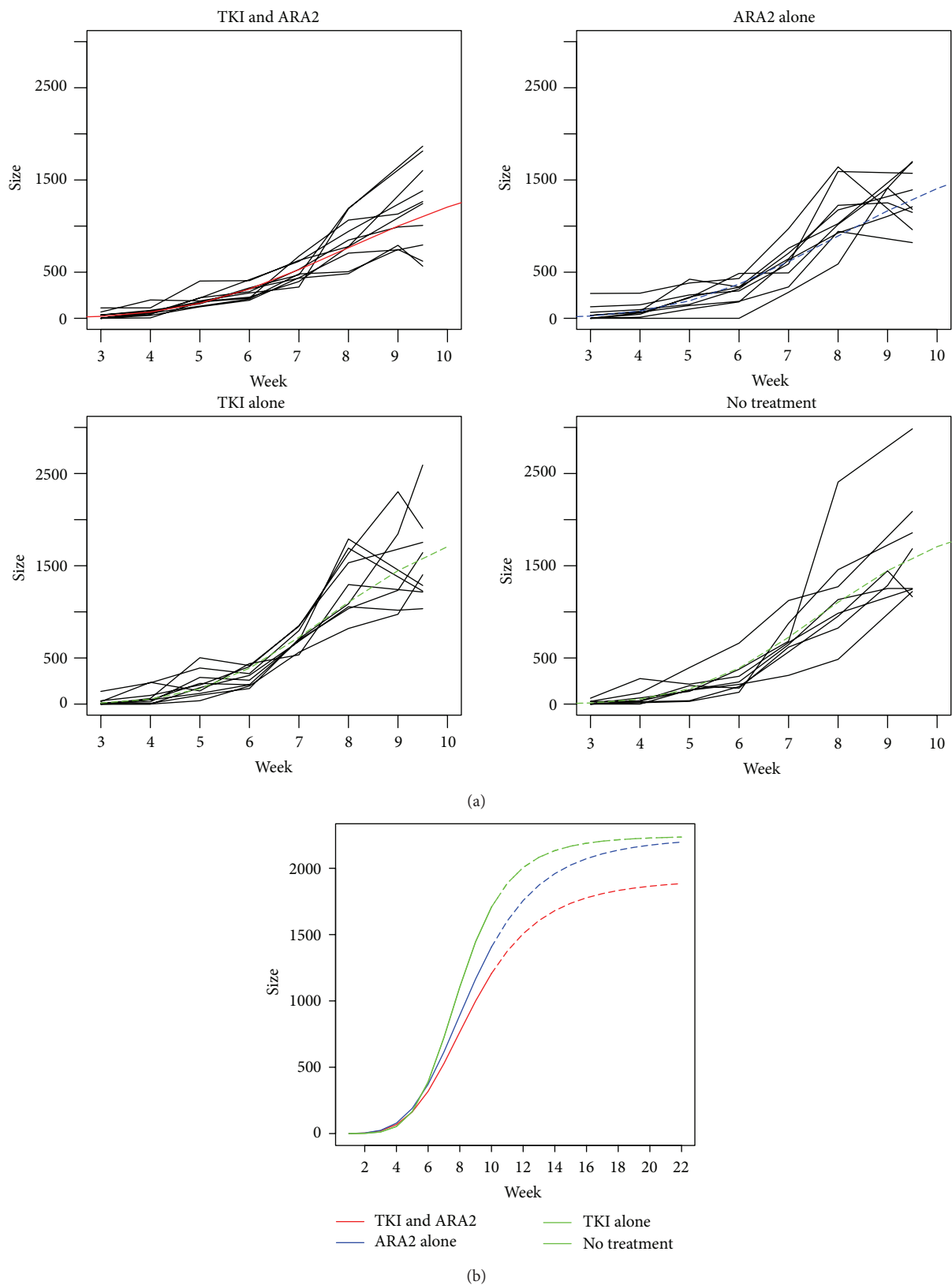


Figure 2: (a) Kinetics of tumor growth separated in four groups with or without telmisartan (ARA2) and sunitinib (TKI). (b) Kinetic curves with prolongation until 22 weeks of the four groups with or without telmisartan (ARA2) and sunitinib (TKI).

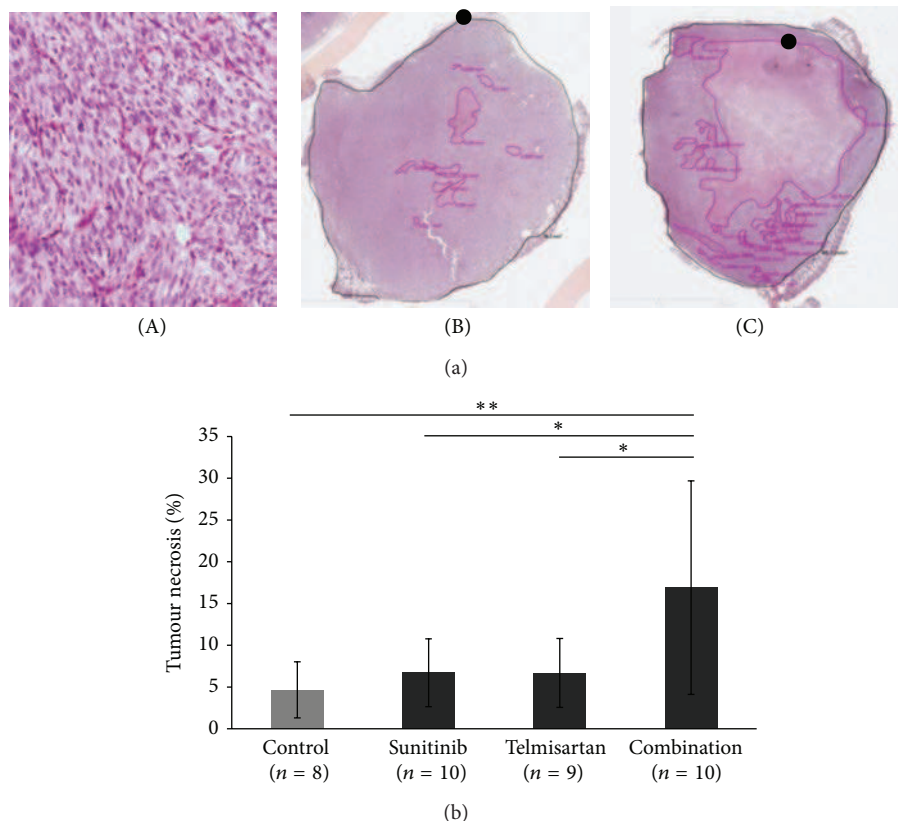


Figure 3: Combination significantly increases tumor necrosis but not sunitinib alone. (a) Histological analysis of tumors by HES staining ($\times 200$) reveals Fuhrman 4 ccRCC (A). Tumor necrosis (•) evaluated by HES staining ($\times 20$) in tumor from control group (B) and tumor from combination of sunitinib and telmisartan (C). (b) Quantification of necrosis in tumors from different groups. Mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$.

Similar combinations of RAS blockers with classical anticancer therapies have already been studied in other murine models [17–20]. The previous works highlighted the antiangiogenic properties or antiproliferative effects of the associated compounds. Sunitinib was developed to target angiogenesis [21] and AT1-R blockers are well known to decrease angiogenesis in numerous experimental studies [22, 23]. Because of the same therapeutic target, this combination could be seen as redundant but might be beneficial for several reasons. The experimental and clinical studies clearly showed that sunitinib mainly acts by inhibiting VEGFR2 activation on endothelial cells [21] which triggers a negative feedback in tumours leading to a VEGF-A oversecretion [24]. Moreover, AT1-R blockers have been described to inhibit VEGF-A secretion by tumour cells [25] and decrease tumor angiogenesis [22, 26] as well as tumour cell proliferation [27]. AT1-R antagonists could also trigger cancer cell apoptosis [28]. RAS blockers have been studied in many types of cancers, principally prostate, breast, and pancreas, but rarely in ccRCC. Though renal tumors are highly vascularised and could represent one novel target for RAS blockers, only one murine model described that ACE-Is prevent the development of distant metastasis [14].

Some authors clearly showed synergistic association between classical antitumour treatments and AT1-R antagonists or ACE-Is. For example, ACE-Is use increases effects

of radiotherapy for the treatment of lung cancer [17]. Similar benefits are obtained in hepatocarcinoma by the association of ACE-Is and 5-fluorouracil [18] or interferon- β [19]. AT1-R blockers also improve the efficacy of gemcitabine on pancreatic tumour growth [20]. Based on these data, class effect of antiangiogenesis of angiotensin receptor blockers remains possible.

This multiple step blockage of VEGF pathway leads to the decrease of central neovascularisation and to the increased necrosis observed in our model. Nevertheless, our model does not show any additive effects on proliferation or apoptosis contrary to results of experimental works in other tumor models [28]. It can be suggested that tumors induced by 786-0 cell injection developed molecular mechanisms which confer a resistance against antiproliferative drug regimen. These findings might not be the same in other ccRCC xenograft models and have to be further explored with primary cell lines.

The clinical use of the combination of telmisartan and sunitinib is yet to be determined. In a previous study, we demonstrated that renal cell carcinomas differently express AT1-R with a high expression level of AT1-R in the most aggressive tumors [11]. As described in breast cancer for estrogen receptors [29], it can be expected that tumors that highly express AT1-R will be more sensitive to telmisartan. This hypothesis needs to be confirmed. In addition, some

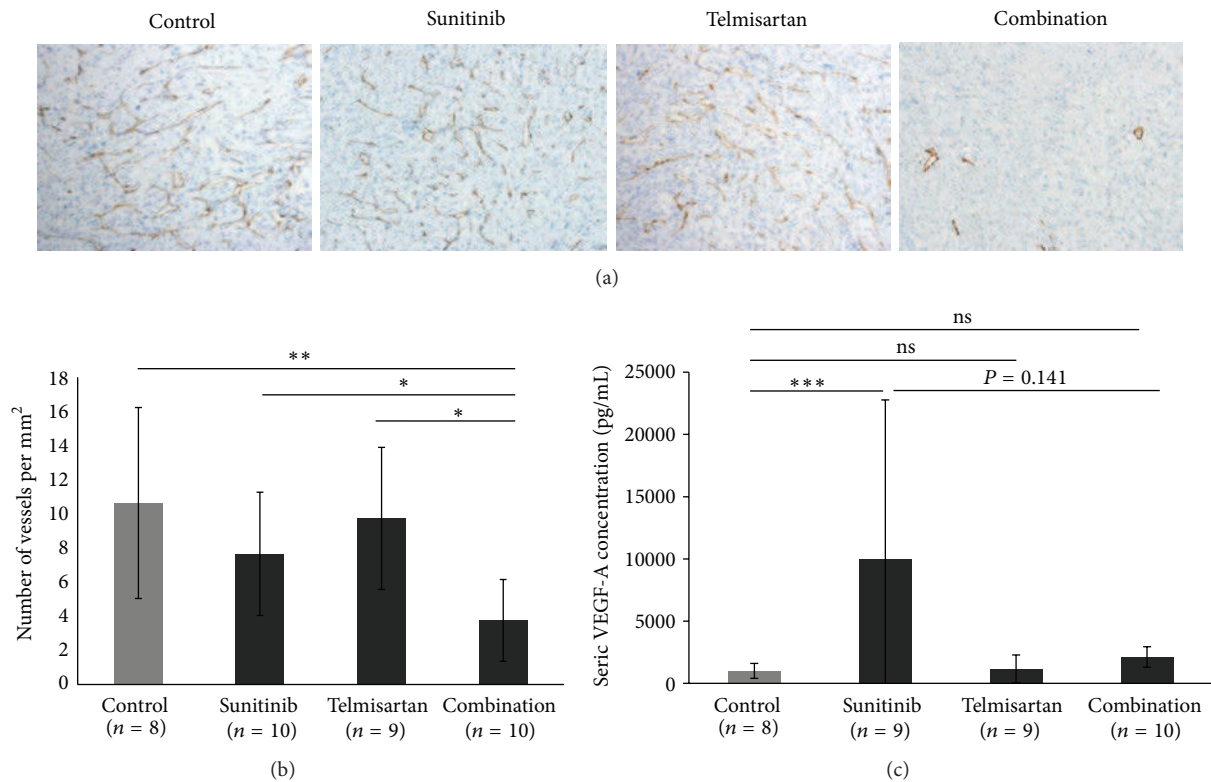


Figure 4: Sunitinib in combination with telmisartan significantly decreases central MVD and tends to decrease seric VEGF-A concentration. (a) Evaluation of central microvascular density by CD31 staining of tumors in a control tumor or after treatment with sunitinib alone, telmisartan alone, and combination (×100). (b) Quantification of central microvascular density as number of vessels per mm². (c) Quantification of seric VEGF-A concentration by ELISA method. Mean ± SEM, **P* < 0.05, ***P* < 0.02, and ****P* < 0.001.

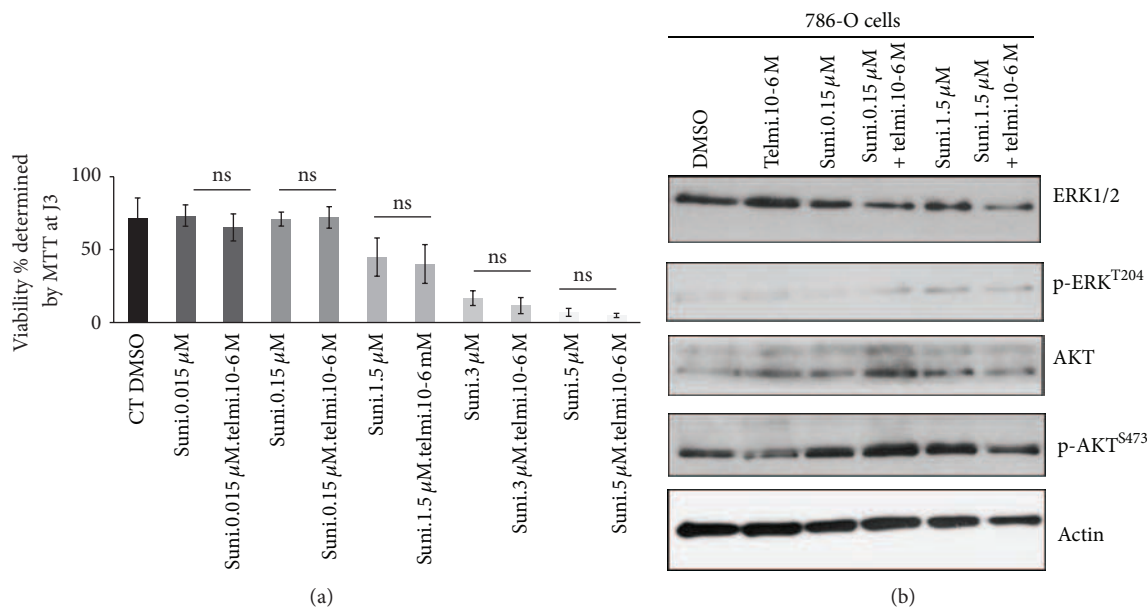


Figure 5: Sunitinib alone or in combination does not modify the expression profile of survival and proliferation pathways. (a) Evaluation of sunitinib toxicity alone or combined with telmisartan by MTT in 786-O cell culture. (b) Western Blot of ERK pathway and AKT pathway in 786-O cell culture.

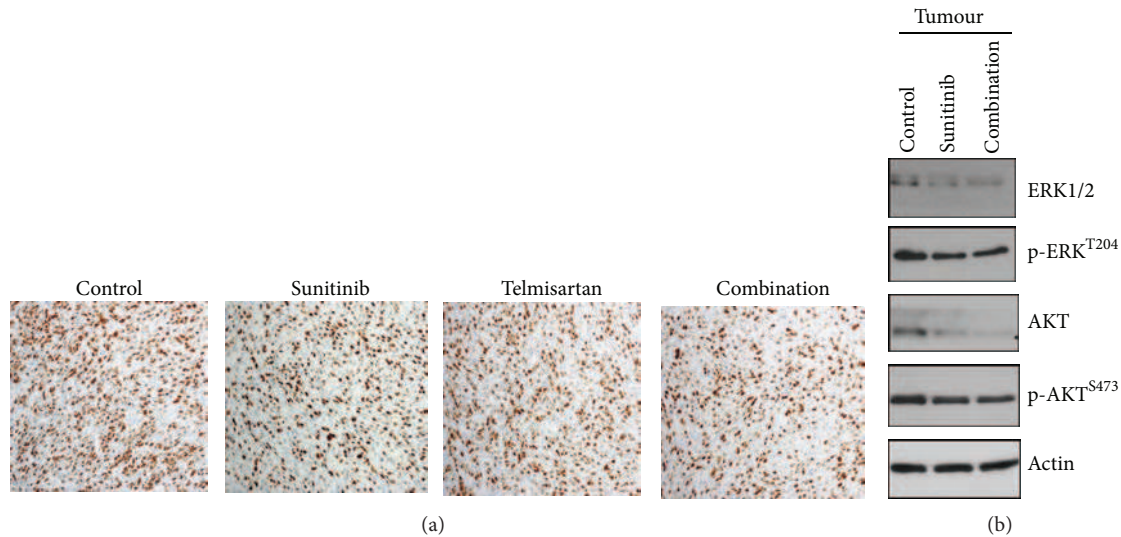


Figure 6: The use of sunitinib and/or telmisartan does not change tumor proliferation or phosphorylation of ERK and AKT. (a) Tumor analysis by Ki67 staining ($\times 200$) in control tumor and after treatment with sunitinib alone, telmisartan alone, and in combination. No difference between groups is observed. (b) Analysis of proteins ERK1/2, AKT, p-ERK1/2, and p-AKT from tumor control and treated group.

clinical retrospective studies have been performed on patients with cancer receiving RAS blockers for hypertension. Among 127 patients presenting metastatic renal cell carcinoma and treated with sunitinib, the use of ACE-I or AT1-R blockers significantly improved response to treatment and overall survival [30]. The survival of patients with a non-small-cell lung cancer also improves when they receive ACE-I or AT1-R blockers to treat hypertension [31]. The risk of recurrence was also reduced in breast cancer by the use of AT1-R blockers [32]. Prospective study with RAS blockers in addition to anti-VEGF therapies is now warranted.

5. Conclusion

Our study demonstrated that telmisartan potentiated antiangiogenic effects of sunitinib in a murine model of xenograft. Combination decreased neovascularisation in the center of the tumor and induced more tumor necrosis. The effect could be the result of a multiple targeting of different pathways on endothelial cells as well as on tumor cells. Such results must be now confirmed in clinical prospective studies.

Conflict of Interests

The authors disclose no potential conflict of interests.

Authors' Contribution

Grégory Verhoest and Thibault Dolley-Hitze are authors of equal contribution.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge BIOSIT fluorescence microscopy platform, Rennes 1 University, BIOSIT

Animalerie, Rennes 1 University, and Plate-forme H2P2 d'histopathologie Biosit/Biogenouest for technical support (Pascale Bellaud, Roselyne Viehl), Rennes University. The authors received grant support from AFU (Association Française d'Urologie) Research Foundation, Rennes 1 University, Région Bretagne.

References

- [1] H. T. Cohen and F. J. McGovern, "Renal-cell carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 23, pp. 2477–2490, 2005.
- [2] N. Rioux-Leclercq, P. Fergelot, S. Zerrouki et al., "Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases," *Human Pathology*, vol. 38, no. 10, pp. 1489–1495, 2007.
- [3] R. J. Motzer, T. E. Hutson, P. Tomczak et al., "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 2, pp. 115–124, 2007.
- [4] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler et al., "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 2, pp. 125–134, 2007.
- [5] O. Rixe, B. Billemonet, and H. Izzedine, "Hypertension as a predictive factor of Sunitinib activity," *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 6, p. 1117, 2007.
- [6] A. Ravaud and M. Sire, "Arterial hypertension and clinical benefit of sunitinib, sorafenib and bevacizumab in first and second-line treatment of metastatic renal cell cancer," *Annals of Oncology*, vol. 20, no. 5, pp. 966–967, 2009.
- [7] F. Deshayes and C. Nahmias, "Angiotensin receptors: a new role in cancer?" *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 16, no. 7, pp. 293–299, 2005.
- [8] C. Röcken, F.-W. Röhl, E. Diebler et al., "The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 16, no. 6, pp. 1206–1212, 2007.

- [9] F. Kikkawa, M. Mizuno, K. Shibata et al., "Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 190, no. 5, pp. 1258–1263, 2004.
- [10] W. Huang, Y.-L. Wu, J. Zhong, F.-X. Jiang, X.-L. Tian, and L.-F. Yu, "Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 53, no. 5, pp. 1206–1210, 2008.
- [11] T. Dolley-Hitze, F. Jouan, B. Martin et al., "Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma," *British Journal of Cancer*, vol. 103, no. 11, pp. 1698–1705, 2010.
- [12] S. Ananth, B. Knebelmann, W. Grüning et al., "Transforming growth factor β 1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma," *Cancer Research*, vol. 59, no. 9, pp. 2210–2216, 1999.
- [13] S. Patyna, A. D. Laird, D. B. Mendel et al., "SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 5, no. 7, pp. 1774–1782, 2006.
- [14] A. Miyajima, T. Kosaka, T. Asano et al., "Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 62, no. 15, pp. 4176–4179, 2002.
- [15] I. Sipahi, S. M. Debanne, D. Y. Rowland, D. I. Simon, and J. C. Fang, "Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials," *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 7, pp. 627–636, 2010.
- [16] T. Dolley-Hitze, G. Verhoest, F. Jouan et al., "Angiotensin-2 type 1 receptors (AT1R) and cancers," *Journal of Nephrology & Therapeutics*, vol. 9, pp. 85–91, 2013.
- [17] R. R. Kohl, A. Kolozsvary, S. L. Brown, G. Zhu, and J. H. Kim, "Differential radiation effect in tumor and normal tissue after treatment with ramipril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor," *Radiation Research*, vol. 168, no. 4, pp. 440–445, 2007.
- [18] K. Yanase, H. Yoshiji, Y. Ikenaka et al., "Synergistic inhibition of hepatocellular carcinoma growth and hepatocarcinogenesis by combination of 5-fluorouracil and angiotensin-converting enzyme inhibitor via anti-angiogenic activities," *Oncology Reports*, vol. 17, no. 2, pp. 441–446, 2007.
- [19] R. Noguchi, H. Yoshiji, S. Kuriyama et al., "Combination of interferon- β and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 16, pp. 6038–6045, 2003.
- [20] R. Noguchi, H. Yoshiji, Y. Ikenaka et al., "Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities," *Oncology Reports*, vol. 22, no. 2, pp. 355–360, 2009.
- [21] D. B. Mendel, A. Douglas Laird, X. Xin et al., "In vivo antitumor activity of SU14813, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 1, pp. 327–337, 2003.
- [22] R. Anandanadesan, Q. Gong, G. Chipitsyna, A. Witkiewicz, C. J. Yeo, and H. A. Arafat, "Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling," *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 12, no. 1, pp. 57–66, 2008.
- [23] T. Kosaka, A. Miyajima, S. Shirotake et al., "Ets-1 and hypoxia inducible factor-1 α inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer," *Prostate*, vol. 70, no. 2, pp. 162–169, 2010.
- [24] B. Martin, J. Edeline, J. J. Patard et al., "Combination of Temsirolimus and tyrosine kinase inhibitors in renal carcinoma and endothelial cell lines," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 138, pp. 907–916, 2012.
- [25] H. A. Arafat, Q. Gong, G. Chipitsyna, A. Rizvi, C. T. Saa, and C. J. Yeo, "Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 204, no. 5, pp. 996–1005, 2007.
- [26] D. Herr, M. Rodewald, H. M. Fraser et al., "Potential role of renin-angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer," *Gynecologic Oncology*, vol. 109, no. 3, pp. 418–425, 2008.
- [27] L. Chow, L. Rezmann, K. Imamura et al., "Functional angiotensin II type 2 receptors inhibit growth factor signaling in LNCaP and PC3 prostate cancer cell lines," *Prostate*, vol. 68, no. 6, pp. 651–660, 2008.
- [28] Q. Gong, M. Davis, G. Chipitsyna, C. J. Yeo, and H. A. Arafat, "Blocking angiotensin II type 1 receptor triggers apoptotic cell death in human pancreatic cancer cells," *Pancreas*, vol. 39, no. 5, pp. 581–594, 2010.
- [29] C. Davies, J. Godwin, R. Gray et al., "Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials," *The Lancet*, vol. 378, pp. 771–784, 2011.
- [30] D. Keizman, P. Huang, M. A. Eisenberger et al., "Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination," *European Journal of Cancer*, vol. 47, no. 13, pp. 1955–1961, 2011.
- [31] S. Wilop, S. Von Hobe, M. Crysandt, A. Esser, R. Osieka, and E. Jost, "Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 135, no. 10, pp. 1429–1435, 2009.
- [32] Y. K. Chae, M. E. Valsecchi, J. Kim et al., "Reduced risk of breast cancer recurrence in patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins," *Cancer Investigation*, vol. 29, no. 9, pp. 585–593, 2011.

Supplementary data: statistical analysis

All individual data were analyzed simultaneously using nonlinear mixed effect models, which allow sharing information across subjects. A three-parameter sigmoidal mixed-effects model was used to describe tumor growth. Parameters were estimated by maximum likelihood (MLE), using the extended stochastic approximation expectation-maximization (SAEM) algorithm as implemented in the saemix package [ref] in the R statistical software (version 2.13, <http://www.Rproject.org>). Treatments effects on each parameter were tested through three covariates: Telmisartan (ARA2), Sunitinib (TKI) and an interaction term (covariate with value of 1 when ARA2 and TKI are given together, 0 otherwise). A backward model selection procedure with Bayesian Information Criteria (BIC) was used to build the final model. The following diagnostic plots were used to assess visually the model fit (not shown): observed vs. population predicted value, individual predicted profiles superimposed on observations and Visual Predictive Check (VPC), using 1000 simulated datasets. The population parameter estimation for each of four groups with or without ARA2 and TKI are reported for this final model. Empirical Bayes estimates were derived from the population parameters and the observed individual data to predict the progression of each individual tumor.

Ref : E. Comets, A. Lavenu, M. Lavielle. 20th PAGE congress, June 2011, Athens

Supplementary data:

Non-linear mixed effect models were used to analyze the longitudinal data. Assuming y_{ij} denotes the j th tumor size measured at time x_{ij} in the i th subject ($i=1,...,N$, $j=1,...,n_i$), the statistical model describes the observed tumor sizes through a model f and individual parameters ψ_i according to the following equation:

$$y_{ij} = f(\psi_i, t_{ij}) + g(t_{ij}, \psi_i, \zeta) \varepsilon_{ij}, 1 \leq i \leq N, 1 \leq j \leq n_i$$

where the vector of individual parameters in subject i , $\psi_i = (\psi_{i,l}; 1 \leq l \leq n_\psi) \in R^{n_\psi}$, is a n_ψ -vector which can be written as $\psi_i = h(\mu; c_i; \eta_i)$, a function of μ , an unknown vector of fixed effects, η_i an unknown vector of random effects and $c_i = (c_{im}; 1 \leq m \leq M)$, a known vector of M covariates. η_i is assumed to follow a multivariate normal distribution with variance-covariance matrix Ω :

$$\eta_i \sim \text{i.i.d. } N(0, \Omega)$$

Here h was chosen to be the exponential function so that the ψ_i are log-normally distributed.

Assuming for instance a treatment effect of ARA2 on the p th parameter ψ_i^p leads to the following covariate model:

$$\psi_i^p = \begin{cases} \mu_{\psi^p} \exp(\eta_i), & \text{when not given ARA2} \\ \mu_{\psi^p} \exp(\beta_{\text{ARA2}, \psi^p}) \exp(\eta_i), & \text{when given ARA2} \end{cases}$$

The errors ε_{ij} are random samples from the standard Gaussian distribution, and the residual error model is defined by a function g a possibly depending on additional parameters ξ . A combined residual error model ($g=a+bf$) has been chosen for g .

In the present analysis, the structural model f was chosen to be the sigmoidal Hill model [ref]:

$$f(\psi_i, t_{ij}) = \text{Size_max}_i (t_{ij})^{\text{gamma}} / ((\text{T50}_i)^{\text{gamma}} + (t_{ij})^{\text{gamma}})$$

where ψ_i is the vector of three parameters Size_max , T50 and gamma for subject i .

Ref: Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, Maire P. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008 Dec;22(6):633-48.

----- Fixed effects -----

Parameter	Estimate	SE	CV(%)	p-value
Size_max	2245.73	210.00	9.42	-
beta_interaction(Size_max)	-0.15	0.10	67.32	0.07
T50	8.05	0.27	3.39	-

beta_ARA2(T50)	0.09	0.03	36.60	0.00
gamma	5.32	0.42	7.85	-
beta_ARA2(gamma)	-0.24	0.10	43.57	0.01
a	9.99	1.90	18.75	-
b	0.27	0.00	0.01	-

----- Variance of random effects -----

Parameter	Estimate	SE	CV(%)
Size_max	0.03	0.01	39
gamma	0.08	0.02	26

Table 1: Estimates of the population parameters and their standard error (SE) and variability (expressed as %) with significant degree for covariate effects on the parameter. The final covariate models are:

$$\text{Size_max}_i = \text{Size_max} \times \exp(\text{beta_interaction}(\text{Size_max}) \times c_{\text{interaction}}) \times \exp(\eta_i),$$

$$\text{T50}_i = \text{T50} \times \exp(\text{beta_ARA2}(\text{T50}) \times c_{\text{ARA2}}) \times \exp(\eta_i),$$

$$\text{gamma}_i = \text{gamma} \times \exp(\text{beta_ARA2}(\text{gamma}) \times c_{\text{ARA2}}) \times \exp(\eta_i),$$

where $c_{\text{interaction}}$ is 1 if the subject receives both ARA2 and TKI together, 0 otherwise, and c_{ARA2} is 1 if the subject receives ARA2, 0 otherwise

The tumor growth in each mouse was modeled via population analysis (Figure 1bis). The final model includes a positive effect of Telmisartan (ARA2) on the inflexion point ($p= 0.0031$), a negative effect on the curvature ($p=0.0109$) and a non significant negative effect ($p=0.0687$) of Sunitinib (TKI) in addition to Telmisartan (ARA2) on the final size of the tumor (table 1, figure 2).

The model suggests that tumor growth is slower with Telmisartan. The trend to a smaller maximal size when both drugs are co-administered can be seen in figure 3 where the group with both drugs has a predicted response lower than that of the other groups over the whole dose range. The predicted size of tumors at 10 and 22 weeks respectively is 1206 and 1864 cc when both drugs are given, 1406 and 2174 cc when Telmisartan is administered alone, and 1707 and 2208 cc respectively in the control group.

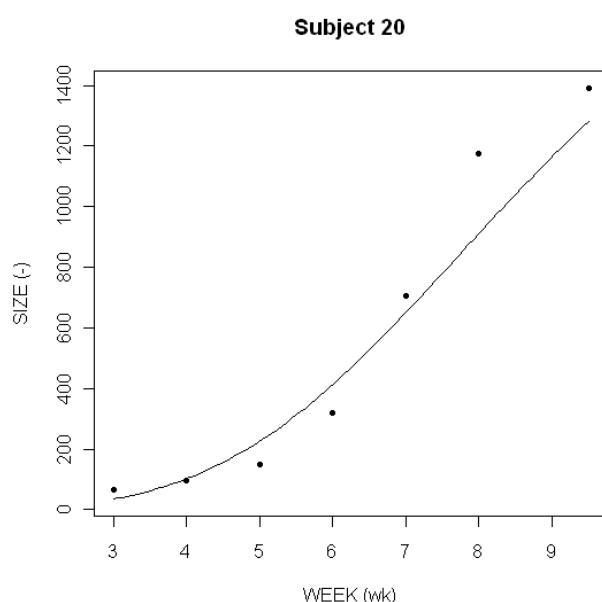


Figure 1 bis: Individual fit of tumor growth for one of the 40 mice.

Group	Size_Max (cc)	T50	gamma
TKI and ARA2	1926°	8.84	4.18
ARA2 alone	2245	8.84*	4.18*
2 groups : TKI alone, and the two drugs	2245	8.05	5.32

*The T50 parameter increases with ARA2 ($p= 0.0031$) and the gamma parameter decreases with ARA2 ($p=0.0109$)

° The Size_Max parameter tends (but no significantly) to decrease when TKI is given in addition to ARA2 ($p=0.0687$)

Table 1: Kinetic parameters of the four groups with or without Telmisartan (ARA2) and Sunitinib (TKI).

Conclusion

L'analyse de ce modèle à partir d'une lignée commerciale semble mettre en évidence une synergie d'action des 2 traitements combinés, notamment dans les tumeurs sarcomatoïdes. Ce modèle présente néanmoins ses limites avec une tumeur sarcomatoïde agressive, qui ne représente pas la majorité des patients présentant un cancer du rein et dont on sait qu'ils répondent plus difficilement aux traitements anti-angiogéniques. Les volumes tumoraux et les réponses aux traitements étaient par ailleurs hétérogènes entre les groupes, mais également au sein même des groupes de souris. Malgré toutes ces limites, la question mérite d'être posée de son utilisation en pratique clinique, au moins spécifiquement chez ces patients avec une tumeur sarcomatoïde pour lesquels les traitements sont encore peu efficaces.

Il était donc nécessaire d'essayer de se rapprocher le plus d'un modèle physiologique humain. Chaque tumeur du rein étant différente de part son histologie et son histoire naturelle, nous avons choisi dans un 2^{ème} temps de mettre au point un modèle murin issu de lignées primaires provenant de tumeurs de patients, puis de tester cette association de traitement.

Mise au point d'un modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires issu de lignées primaires.

a- Lignées primaires sélectionnées

1- Lignée R-180

Cette lignée primaire est issue d'un patient de 66 ans, opéré en 2001 d'un carcinome rénal à cellules claires classé pT3aN0M0 de grade 3 de Furhman. Après relecture des lames, l'histologie ne mettait pas en évidence de composante sarcomatoïde. L'évolution était rapidement péjorative avec un décès survenant en 12 mois.

Caractérisation de la lignée par analyse caryotypique.

Une analyse du caryotype de cette lignée primaire a donc été réalisée dans le laboratoire de Cytogénétique. Cette formule a été établie en bande R et en FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) multi couleur selon la classification et la nomenclature internationale de la Société de Cytogénétique.

Cette analyse montrait une lignée R-180 hypodiploïde. On retrouvait une délétion du bras court du chromosome 3, porteur du gène VHL, du bras court du chromosome 8 et 9, et la perte d'une copie du chromosome 4 et 14 (Figure 5). Dans la littérature, la perte des chromosomes 4, 9 et 14 est associée à un facteur de mauvais pronostic⁸⁵.

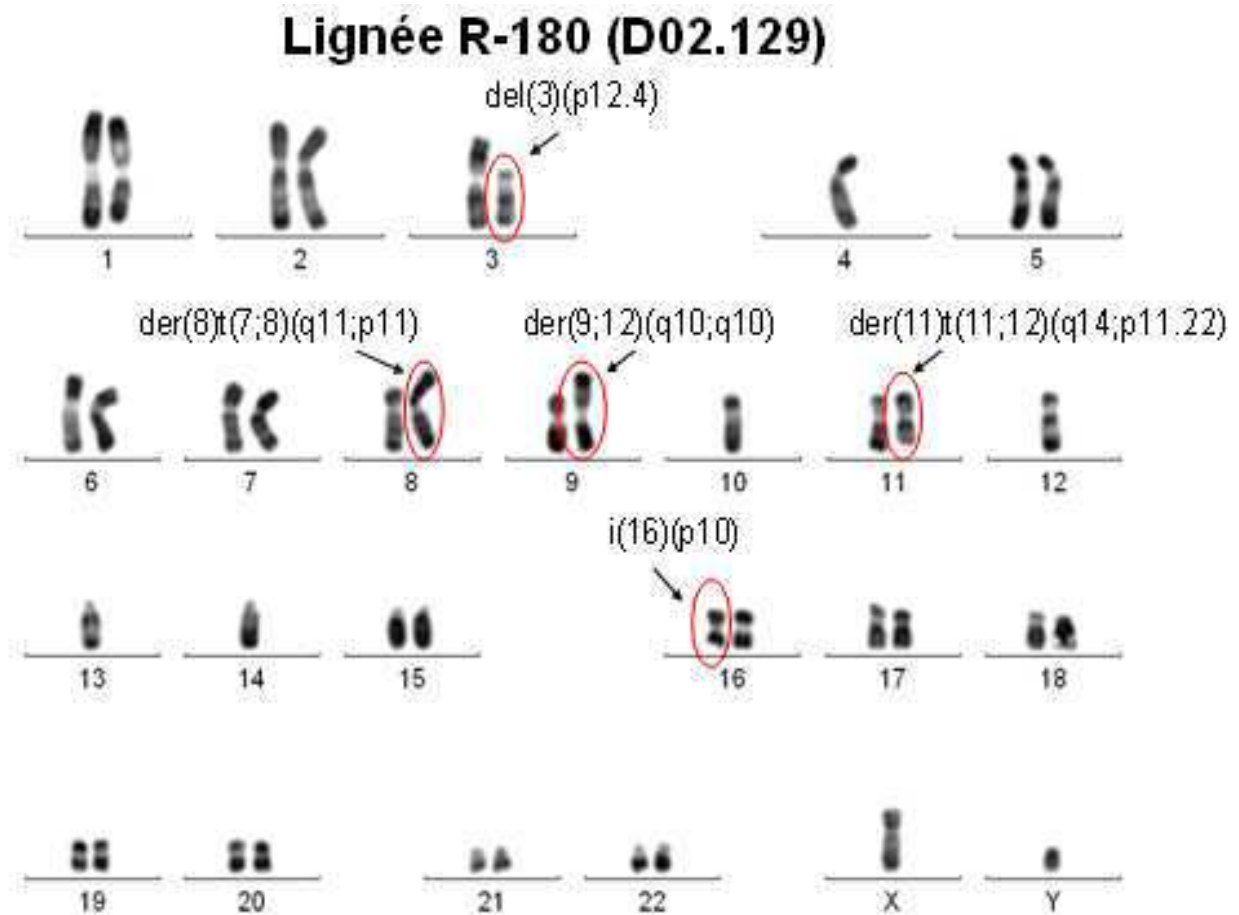


Figure 5 : Analyse de la formule chromosomique de lignée R-180 en bande R: 42, XY, $\text{del}(3)(p12.4)$, -4, $\text{der}(8)t(7;8)(q11;p11)$, $\text{der}(9;12)(q10;q10)$, $\text{der}(11)t(11;12)(q14;p11.22)$, -13, -14, $i(16)(p10)[17]/42, \text{idem}$, - $\text{del}(3)(p12.4)$, + $\text{der}(3)t(2;3)(?:p12)$, $i(5)(q10)[3]$

2- Lignée R-175

Cette lignée primaire est issue d'un patient opéré en 2001 d'un carcinome rénal à cellules claires, classé pT3aN0M0 de grade 4 de Furhman. Après relecture des lames, l'histologie retrouvait une composante sarcomatoïde. L'évolution était rapidement péjorative avec un décès survenant en 15 mois.

Caractérisation de la lignée par analyse caryotypique.

Une analyse du caryotype de cette lignée primaire a également été réalisée dans le laboratoire de Cytogénétique. Cette formule a été établie de la même façon en bande R et en FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) multi couleur selon la classification et la nomenclature internationale de la Société de Cytogénétique.

Pour cette lignée, l'analyse était plus complexe avec de nombreux remaniements chromosomiques, des anomalies de structures et de nombre, rendant difficile l'établissement d'une formule chromosomique. Malgré tout, une délétion du bras court du chromosome 3 était retrouvée.

b- Mise au point du modèle animal

Dans un 1^{er} temps, 10 millions de cellules tumorales issues des lignées R-180 et R-175 ont été injectées dans le flanc en sous cutanée à 4 souris *Balb/c nude* (Laboratoire Janvier, France) âgées de 6 à 8 semaines comme nous l'avions fait précédemment pour la lignée 786-O. Deux souris par lignée ont été injectées avec 10 millions de cellules.

Après 8 semaines d'attente, jamais aucune tumeur ne s'est développée chez ces 4 souris.

S'appuyant sur les données de la littérature et le développement de modèles murins de xénogreffe dans d'autres types de cancers⁸⁶, nous avons décidé d'associer aux cellules tumorales des cellules endothéliales de type HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), et de les cultiver sur du Matrigel. Les cellules tumorales ont en effet des besoins énergétiques requérant entre autre, du glucose, de la glutamine et des lactates pour permettre de développer cette bioénergie et biosynthèse nécessaire à la prolifération cellulaire⁸⁷. Le Matrigel est en ce sens un assortiment de protéines de la matrice extra-cellulaire nécessaire au développement et au maintien de toute une variété de cellules. Il mime ainsi cette matrice en cancérologie et en culture cellulaire, reproduisant les interactions entre la cellule et la matrice extra-cellulaire. Il est composé entre autre de laminine, de collagène de type IV, d'enactine, mais aussi de facteurs de croissance nécessaires à la croissance tumorale⁸⁸.

1- Culture cellulaire

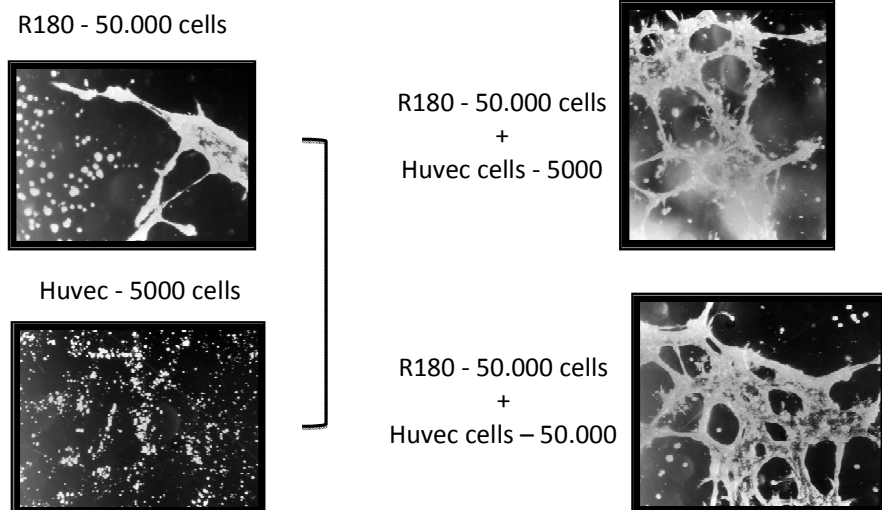
Les cellules tumorales issues de la lignée primaire R-180 (50 000 ϕ) ont été mises en co-culture avec des cellules endothéliales de type HUVEC (5 000 ϕ) sur du Matrigel. En parallèle, des cellules R-180 et HUVEC étaient mises en culture de manière séparée.

Pour ces essais, nous avons déposé le matrigel en couche fine (0.5mm) au fond de plaque 12 puits. Le matrigel est liquide entre -20° et +4 ° C et se gélifie rapidement entre 22 et 35°C. C'est pourquoi, la plaque, les cônes et le matrigel sont placés une nuit à 4° C dans la glace.

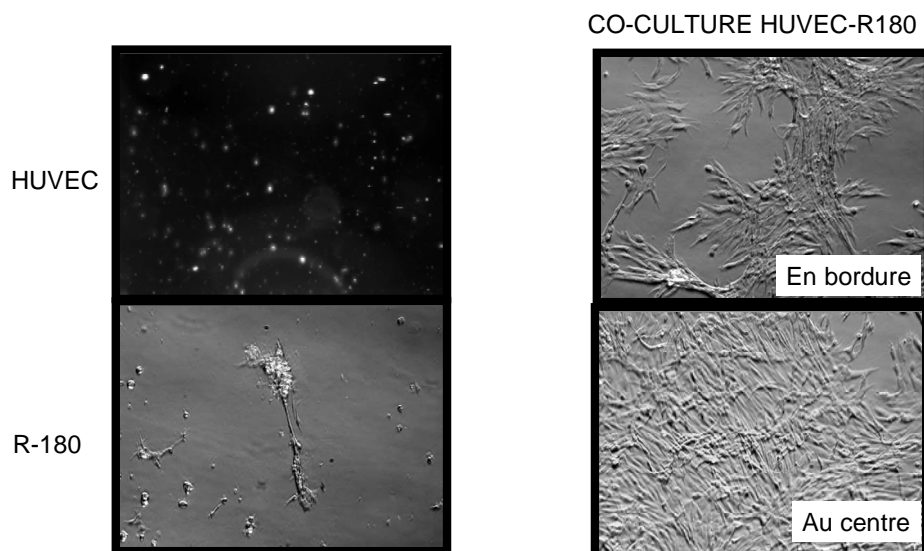
300 µl de matrigel/puit sont ensuite déposés sur la plaque et incubés 2 heures à 37°C pour accélérer la gélification.

Les 2 types cellulaires (tumoraux issues de la lignée primaire R-180 (50 000 €) et HUVEC Human Vein Endothelial Cells (LONZA) (5000 €)) sont ensuite mis en culture à 37°C à 5% de CO₂ en milieu humide, séparément dans leur milieu de culture respectif (RPMI 140-SVF10%, EGM-2) ou ensemble en milieu mixte (50-50).

Dès 48 heures, nous pouvons observer la formation d'un réseau cellulaire dans les puits de co-culture favorisant le maintien et le développement de la lignée tumorale (Figure 6).



J2



J6

Figure 6 : Aspect en microscopie inversée (DMIRBE LEICA) –G 1.6 (*10)- G5 (*10) de la co-culture des cellules tumorales R-180 et HUVEC sur du Matrigel montrant la formation d'un réseau cellulaire à J2 et J6.

2- Xénogreffe

Quatre nouvelles souris *Balb/c nude* âgées de 6 à 8 semaines (Laboratoire Janvier, Laval – France) ont donc été injectées en sous-cutanée dans le flanc gauche. Un rapport de 1/5 était respecté entre cellules tumorales et cellules endothéliales, conformément aux données de la littérature⁸⁶. Le culot cellulaire était injecté avec du Matrigel pour un volume total de 250 μ l :

- 1 souris a été injectée avec 6 millions de cellules R-180 et 1 million d'HUVEC
- 1 souris a été injectée avec 10 millions de cellules R-180 et 2 millions d'HUVEC
- 1 souris a été injectée avec 6 millions de cellules R-175 et 1 million d'HUVEC
- 1 souris a été injectée avec 10 millions de cellules R-175 et 2 millions d'HUVEC

Après 6 semaines de développement tumoral, seules les 2 souris injectées avec la lignée R-175 ont développé une tumeur dans le flanc d'un volume moyen de 200 mm³ (Figure 7).

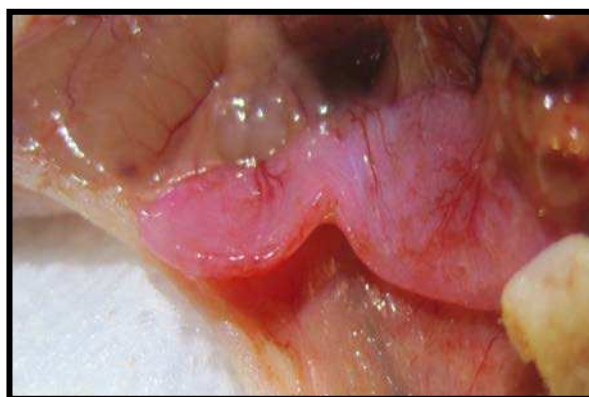


Figure 7 : Tumeur de 200 mm³ côté gauche, montrant une néoangiogénèse tumorale. Conformément au protocole d'anesthésie précédemment décrit, les souris ont été euthanasiées par injection intra-musculaire de Kétamine et Xylazine 2%. La tumeur était prélevée pour analyse histologique après fixation dans une solution de formaldéhyde à 10% et inclusion en paraffine.

3- Analyse histologique

L'analyse histologique de ce modèle en développement va mettre en évidence un carcinome rénal à cellules claires de haut grade de malignité (Furhman 4), avec présence d'une composante sarcomatoïde chez ces 2 souris. Sur ces tumeurs, 2 zones étaient observées en microscopie optique: l'une composée d'un ccRCC pure (zone 1), et l'autre d'ccRCC à forte composante fibreuse (zone 2), correspondant à du Matrigel non résorbé (Figure 8).

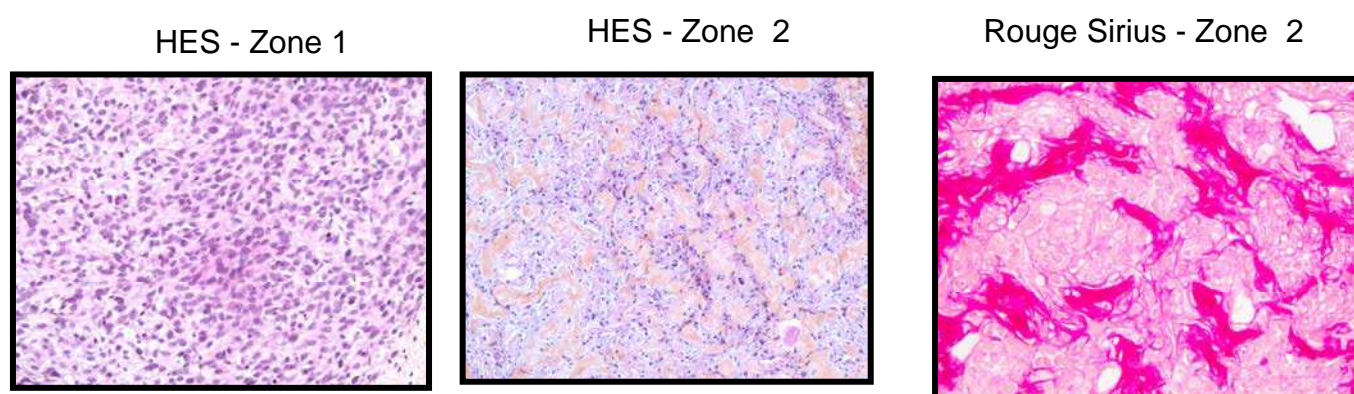
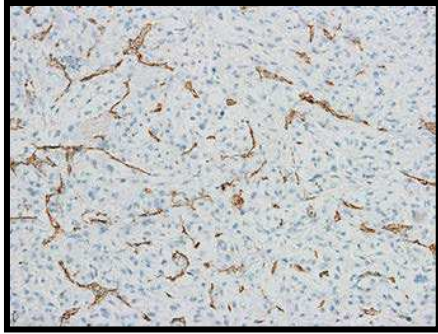


Figure 8 : HES sur xénogreffe au stade de 6 semaines après injection (*200) retrouvant 2 zones tumorales différentes : la zone 2 retrouvant du ccRCC avec une composante fibreuse, et la zone 1 du ccRCC uniquement. Immunomarquage CD 31 de la tumeur R-175 montrant des vaisseaux matures au niveau central comme périphérique. La coloration au rouge Sirius confirme la présence de collagène correspondant au Matrigel non résorbé.

Des marquages immunohistochimiques ont également été réalisés avec l'anticorps anti-CD31 (1:50, anticorps monoclonal de rat, clone SZ 31, Dianova, Germany), afin d'évaluer la vascularisation de cette tumeur, et avec l'anticorps Ki67 (1:100, anticorps monoclonal de lapin, clone SP6, Interchim, France) pour mesurer l'index de prolifération. Ces 2 tumeurs montraient une vascularisation périphérique et centrale mature avec un index de prolifération élevé, supérieur à 80% (Figure 9). L'observation des fibres de collagène a été réalisée en colorant des coupes en paraffine de 4 μ m par le Rouge Sirius à 0,1%, après déshydratation et incubation 1h dans cette solution (Figure 8).

CD 31



Ki 67

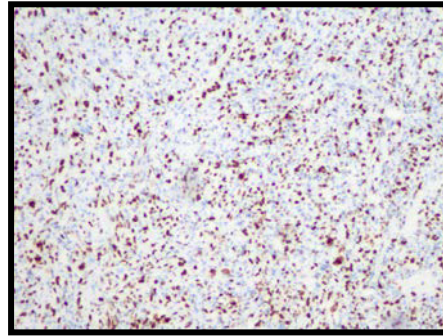


Figure 9 : Immunomarquage anti-CD 31 de la tumeur R-175 montrant des vaisseaux matures au niveau central comme périphérique, et anti-Ki67 montrant un index de prolifération élevé (G*200).

Si l'on comparait les coupes en paraffine du patient dont est issue la lignée cellulaire R-175, et les coupes de la tumeur prélevée chez la souris, celles-ci étaient parfaitement comparables et présentaient toutes deux une composante sarcomatoïde, des vaisseaux matures sur l'immunomarquage au CD31, et le même index de prolifération sur l'immunomarquage Ki67 (Figure 10).

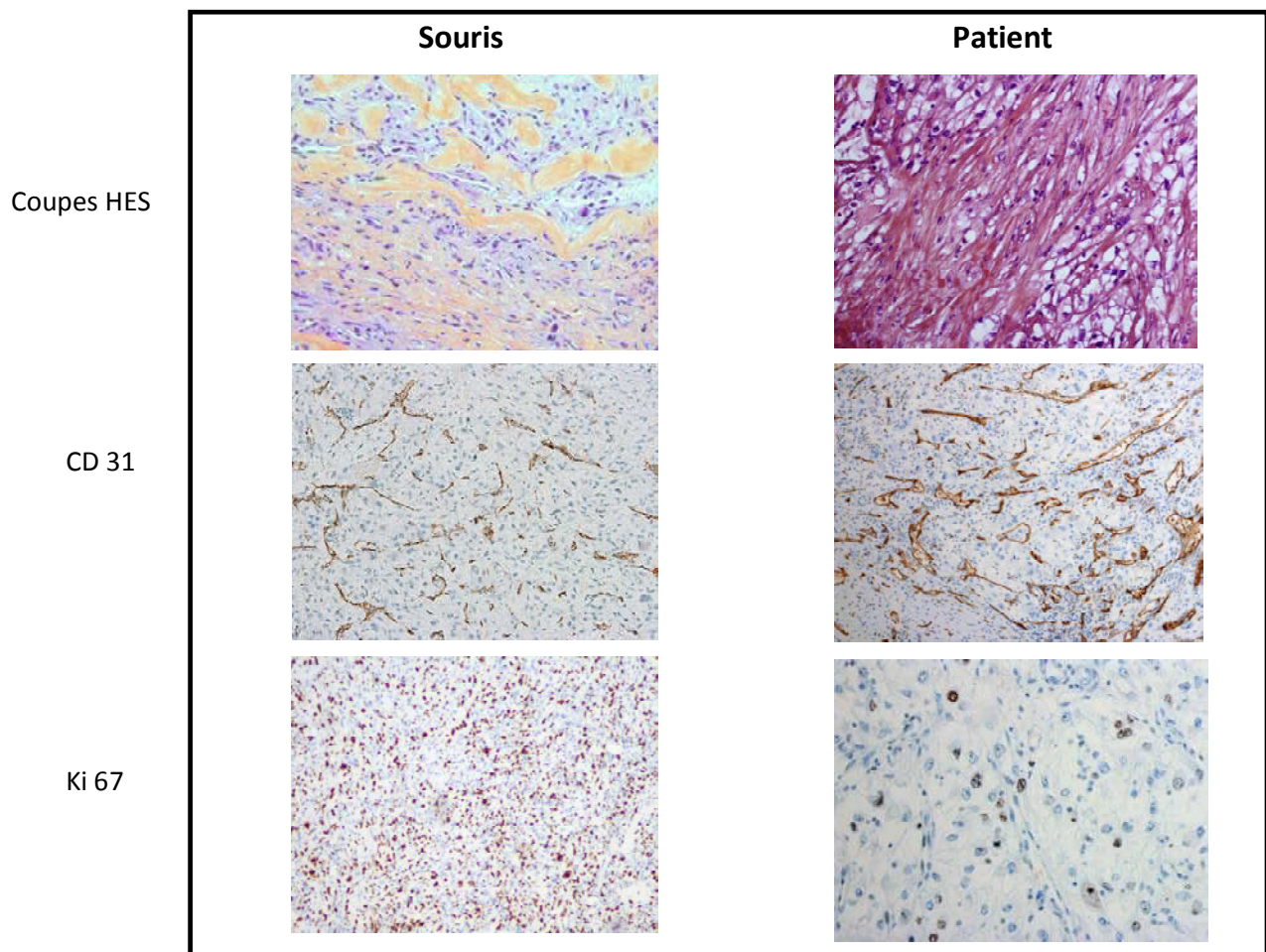


Figure 10 : Analyse en paraffine des tumeurs du patient de la lignée R-175 et de la souris injectée et immunomarquage du CD31 et du Ki67 (X 100).

c- Evaluation des traitements sur le modèle mis au point

La mise au point de ce nouveau modèle tumoral issu d'une lignée primaire semble permettre d'obtenir un modèle expérimental plus proche de la tumeur originelle des patients. L'association du sunitinib au telmisartan a donc pu être de nouveau testée sur ce modèle plus « physiologique ».

1- Matériel et Méthodes

Développement du modèle tumoral et traitements

Quinze souris *Balb/c nude* âgées de 6 à 8 semaines ont donc été injectées en sous-cutané dans le flanc gauche avec 6 millions de cellules tumorales issues de la lignée R-175 et 1 million de cellules HUVEC dans 250 µl de Matrigel.

Les souris étaient pesées 1 fois par semaine afin de surveiller leur état général. La croissance tumorale était également évaluée 1 fois par semaine à compter de l'apparition d'un nodule mesurable et jusqu'au sacrifice, soit dès la 8^{ème} semaine après injection. Celle-ci était mesurée à l'aide d'un caliper en prenant la longueur (a), la largeur (b) et la hauteur (c). Le volume tumoral était ainsi calculé selon la formule : $(a \times b \times c) \times 0.5236$.

Huit semaines après l'injection, les volumes tumoraux dépassant à peine 200 mm³, il a été décidé d'attendre quelques semaines de plus pour obtenir des tumeurs plus volumineuses et ainsi mieux évaluer l'impact des traitements. Le traitement des souris a donc débuté 16 semaines après l'injection tumorale.

Sur les quinze souris injectées, deux n'ont développé aucune tumeur et une souris a dû être euthanasiée avant de débiter le traitement conformément au protocole déposé au Comité d'éthique des souris, du fait d'un volume tumoral trop important occasionnant une souffrance animale (douleurs, perte de poids). Sur les 12 restantes, 8 avaient développé une tumeur d'un

volume moyen de 280 mm³, et 4 souris avaient de plus volumineuses tumeurs avec une moyenne de 1900 mm³.

Les souris étaient ensuite réparties en 3 groupes, de telle sorte que les volumes tumoraux soient homogènes entre les groupes. Un premier lot composé de 3 souris recevait le vecteur seul constitué par le diluant utilisé pour les traitements (DMSO), un deuxième groupe de 4 souris recevait le sunitinib à la dose de 40 mg/kg/j, et enfin un troisième groupe composé de 5 souris recevait l'association du sunitinib (40 mg/kg/j) et du telmisartan (5 mg/kg/j). Les drogues étaient préparées et diluées selon le protocole décrit en 1^{ère} partie de ce travail.

Après 4 semaines de traitement, les animaux étaient euthanasiés 24h après avoir reçu la dernière dose selon le protocole décrit également en 1^{ère} partie utilisant de la kétamine et de la xylazine 2% injectables. La masse sanguine était prélevée par ponction intra-cardiaque pour être centrifugée à 8 000 g, puis le sérum était recueilli pour congélation à -80°C avant analyse. La tumeur était prélevée dans sa totalité pour analyse. Lorsque le volume tumoral restant le permettait, celle-ci était répartie en 2 prélèvements : un en congelé dans l'azote liquide et un fixé dans le formaldéhyde à 10% pour analyse en paraffine.

Analyse histologique et immunohistochimique (IHC)

L'analyse histologique a été réalisée sur des coupes en paraffine de 4 µm colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Toutes les lames ont été interprétées en aveugle par un seul Anatomo-Pathologiste (Pr RIOUX-LECLERCQ).

L'analyse IHC était réalisée sur des coupes paraffines de 4 µm, utilisant les anticorps primaires contre le Ki67 (1 :100, anticorps monoclonal de lapin, clone SP6, Interchim, Frnace) et le CD31 (1 :50, anticorps monoclonal de rat, clone SZ31, Dianova, Germany) utilisés dans la 1^{ère} partie et selon le protocole précédemment décrit. L'observation des fibres de collagène a été réalisée en colorant des coupes en paraffine de 4 µm par le Rouge Sirius à 0,1%, après déshydratation et incubation 1h dans cette solution.

Mesure du VEGF par ELISA

La concentration sérique du VEGF a été déterminée par la technique ELISA en accord avec les instructions du fournisseur (Quantikine ELISA VEGF, R & D, USA).

2- Résultats

Analyse de la croissance tumorale

L'analyse de la croissance tumorale montre des différences entre les 3 groupes, mais aussi au sein des groupes. Dans les 3 souris traitées par placebo, 2 présentaient une augmentation de la croissance tumorale au cours du traitement et une seule présentait une évolution stable. Dans le groupe sunitinib, 3 des 4 souris présentaient une résistance au traitement puisqu'on notait une progression de la croissance tumorale. Une seule présentait une stabilisation de sa maladie. Enfin dans le groupe associant les 2 traitements, la réponse semblait meilleure. Deux souris présentaient en effet une stabilisation de leur tumeur, et deux souris montraient une bonne réponse au traitement avec une diminution voire une fonte tumorale (Figure 11).

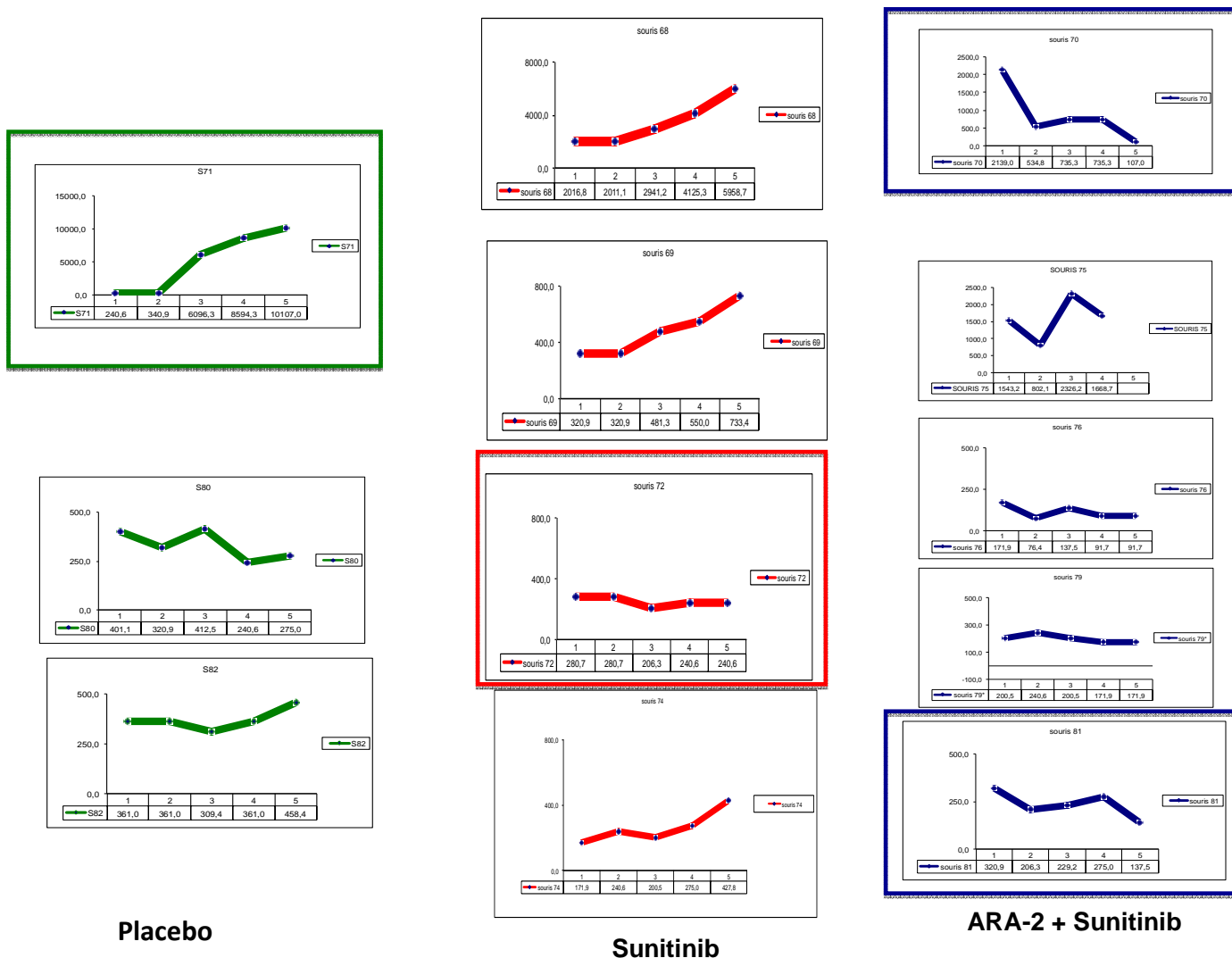


Figure 11 : Mesure de la croissance tumorale de la lignée primaire R-175 en fonction des différents traitements reçus.

Analyse histologique et IHC

Toutes les souris présentaient des ccRCC de haut grade de malignité (Furhman 4), avec une composante sarcomatoïde. Il n'y avait pas de nécrose tumorale observée, quelque soit le lot de souris. L'analyse IHC ne montrait pas de différence entre les 3 groupes en terme de prolifération cellulaire (Ki67), avec des index élevés même dans les tumeurs ayant fortement régressé : 76% dans le groupe DMSO, 68% pour le sunitinib et 73% dans le groupe associant les 2 traitements (p= ns).

Concernant la néovascularisation, on notait des vaisseaux matures en périphérie comme au centre de la plupart des tumeurs quel que soit le traitement reçu. Si aucune différence n'était relevée entre le groupe sunitinib et le groupe association, la néovascularisation était néanmoins inférieure en comparaison des souris traitées par placebo (Figure 12).

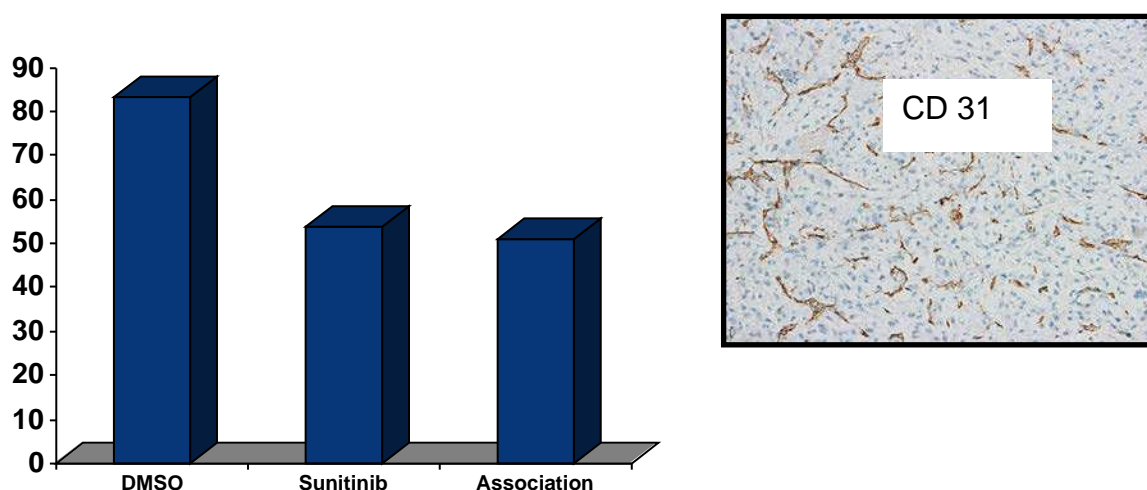


Figure 12: Comparaison de la néovascularisation en fonction des groupes par analyse du CD31 en IHC. La vascularisation montre des vaisseaux matures en périphérie comme au centre de la tumeur.

Le Rouge Sirius colore tous les types de collagène (I, II, III, IV, V), et en particulier le type IV, constituant majoritaire des membranes basales et du Matrigel utilisé dans notre expérience. Cette coloration (figure 13) a permis de comprendre le mécanisme d'interaction de ce support avec nos cellules et de retracer l'évolution de la croissance de la tumeur.

Au départ, le Matrigel agit comme un maillage en capturant les cellules (stade 1), assurant leur apport en nutriments et permettant ainsi leur développement et l'organisation des premiers néovaisseaux. Au fil de la croissance tumorale, les quantités de Matrigel se trouvent divisées (stade 2) pour finir par disparaître (stade 3). A ce stade de croissance, la tumeur a pu constituer son propre réseau d'apports en nutriment par la néoangiogénèse. Le collagène alors marqué en rouge ne représente plus du Matrigel mais bien le collagène des vaisseaux. En effet, le marquage observé est beaucoup plus fin et formes des lumières sur la coupe. De plus

lorsqu'on superpose cette coloration à celui d'un marquage au CD31, les mêmes images sont observées.

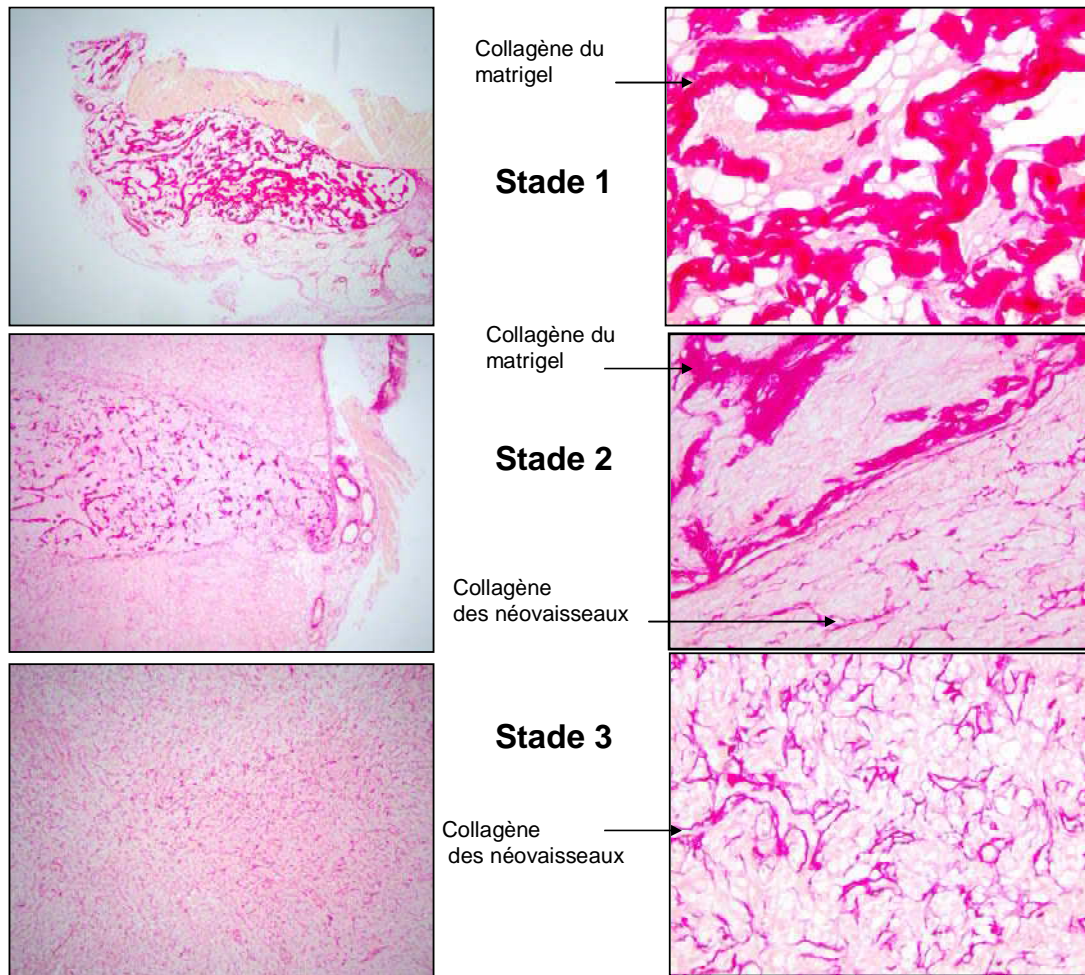


Figure 13 : Analyse de la présence et de l'évolution du Matrigel en fonction du volume tumoral par coloration au rouge Sirius (X25 et X200). Le stade 1 est retrouvé sur des tumeurs de faible volume (<450 mm³) avec beaucoup de collagène présent (absence de lumière, donc pas un néovaisseau). Le stade 2 montre un îlot central de Matrigel avec un développement tumoral tout autour et quelques néovaisseaux dans la tumeur (volume entre 700 et 1000 mm³). Le stade 3 montre une fixation des néovaisseaux uniquement, sans travées de collagène retrouvées (volume > 5900 mm³).

A noter que l'analyse de la souris euthanasiée sur ordre du vétérinaire avant de débiter tout traitement, montrait un volume tumoral majeur de $10 \cdot 10^7 \text{ mm}^3$ (soit 5 à 36 fois plus important que les autres tumeurs). L'histologie retrouvait également un ccRCC Fuhrman 4, avec une composante sarcomatoïde. En revanche, à la différence des autres souris, il était noté des thrombi tumoraux dans les vaisseaux, ainsi que des métastases pulmonaires.

Analyse du VEGF sérique

L'analyse en ELISA de la concentration de VEGF circulant fut malheureusement non contributive, quelque soit le groupe de traitement, avec des seuils de détection trop faibles pour être analysés. Ceci s'explique probablement du fait des faibles volumes tumoraux (Figure 14).

Souris	DO	C° pg/ml
68	0,023	<min
69	0,007	<min
70	0,002	<min
72	0,001	<min
74	0,007	<min
76	0,014	<min
78	0,006	<min
79	0,011	<min
80	0,005	<min
81	0,111	72,25
82	0,019	<min

Figure 14 : Analyse des concentrations du VEGF sérique circulant chez les souris en technique ELISA.

Discussion

Le développement de ce nouveau modèle animal issu d'une lignée primaire a donc permis de mettre au point un modèle expérimental plus proche de la réalité des tumeurs des patients. Le fantasme sous-jacent étant à long terme de pouvoir traiter les patients « à la carte », en fonction de la réponse de leur propre tumeur aux différentes thérapeutiques à disposition et testées au préalable sur animaux. Pour le moment, peu d'études pré-cliniques ont pu être réalisées, mais les premiers résultats sont très encourageants. Etudiant 14 patients avec des cancers solides avancés et réfractaires à toute thérapeutique, une équipe a pu implanter ces tumeurs chez des souris *nude* puis tester différents traitements. Parmi eux, 11 ont reçu par la suite un traitement guidé par le modèle expérimental dont 88% présentaient une réponse partielle durable avec une excellente corrélation entre le modèle animal et la réponse chez les patients en terme de résistance et de sensibilité⁸⁹. Mais ces données nécessitent d'être confirmées par d'autres travaux.

Dans cette 2^{ème} partie, il semble que l'association du sunitinib au telmisartan permette de réduire considérablement le volume tumoral. Pour autant, la mécanistique reste complexe à expliquer. En effet, contrairement à la 1^{ère} partie sur une lignée commerciale, cette association de traitement n'engendrait pas plus de nécrose tumorale, et aucune différence n'était notée en termes de prolifération cellulaire ou de néovascularisation. Malgré tout, l'effet clinique est bien réel et très prometteur dans la mesure où les ccRCC présentant une composante sarcomatoïde sont connus pour être plus résistants aux traitements anti-angiogéniques⁹⁰. Des analyses plus poussées, notamment en Western Blot et IHC, étaient malheureusement limitées par le peu de tumeur résiduelle pour plusieurs souris. De nouvelles données expérimentales sont donc nécessaires pour confirmer ces résultats prometteurs. Dans la littérature, on trouve cependant de nombreux exemples dans différents types de cancers venant étayer l'effet anti-

tumoral des ARA-2⁹¹. Tout récemment, une étude réalisée sur un modèle d'ascite carcinomateuse confirmait les données retrouvées dans notre travail sur le ccRCC.

L'association de l'olmesartan au sorafenib permettait d'accroître l'efficacité anti-tumorale en réduisant les taux de VEGF sérique et la densité microvasculaire⁹². En urologie, plusieurs modèles animaux de traitement avec des ARA-2 ont montré une réduction du volume tumoral. Le mécanisme incriminé était toujours lié à une réduction de l'angiogénèse par diminution de la sécrétion de VEGF-A par les cellules tumorales comme dans le cancer de prostate⁹³, ou une réduction de la densité microvasculaire dans le cancer de vessie⁹⁴ comme dans le ccRCC⁹⁵. Ces données ont été également décrites dans d'autres types de cancers (ostéosarcome, mélanome, sein, pancréas)⁹⁶. Dans le ccRCC, une seule étude rétrospective reprenant 127 patients traités par sunitinib entre 2002 et 2010 et prenant un bloqueur du SRA (IEC ou ARA-2) a démontré une diminution significative de la survie sans progression, mais non significative sur la survie globale⁹⁷. Pour autant, comprendre la fonctionnalité et l'implication des récepteurs à l'angiotensine-II dans ces tumeurs reste inexpliqué. Il est encore difficile de dire si les voies de signalisation activées dans la cancérogénèse sont les mêmes que dans les conditions physiologiques. La faible expression des récepteurs AT1-R et AT2-R dans les ccRCC de bas grade de Fuhrman montre par ailleurs l'absence probable d'implication de ces récepteurs dans le développement tumoral, tout au moins à son début⁹⁸.

Comprendre ces mécanismes nous permettrait certainement d'évoluer dans la prise en charge thérapeutique des patients. L'utilisation des ARA-2 en association aux TKI est en effet largement envisageable en pratique clinique chez les patients métastatiques. Mais on peut aussi se demander si le prescrire en prévention secondaire des récidives des ccRCC ne serait pas non plus prématuré, comme cela a pu être démontré dans le cancer de vessie⁹⁹. Reste à déterminer si les patients exprimant le plus AT1-R seront plus sensibles aux ARA-2, comme cela a été décrit dans le cancer du sein pour les récepteurs aux oestrogènes ?

Ce modèle présente néanmoins ses limites. On observe en effet une disparité de développement tumoral au sein des différents groupes de souris, et une hétérogénéité de réponse aux traitements au sein des mêmes groupes. Pourtant, tous les animaux présentaient des caractéristiques identiques initiales (même âge, même poids, même patrimoine génétique), et ont reçu le même jour la même quantité de cellules tumorales. Le modèle murin reste cependant le modèle animal le plus utilisé en cancérologie du fait de sa simplicité d'utilisation et de son faible coût. Il est par ailleurs assez proche génétiquement de l'Homme. Plusieurs modèles murins immunodéficients sont à disposition: les souris nude, scid, beige, xid, rag-1 null, rag-2 null, ou des souris combinant plusieurs mutations (nude/beige, beige/nude/xid, etc...). La souris *Nude* reste le modèle idéal et le plus utilisé en cancérologie du fait de l'absence de système immunitaire et du risque de rejet, dont la réponse intrinsèque de chaque animal pourrait expliquer ces différences¹⁰⁰. L'injection de cellules tumorales en suspension présente de meilleurs taux de succès d'implantation et de développement tumoral comparativement à l'implantation de tumeur solide directement issue d'un patient pour le même type histologique¹⁰¹. Mais elle présente également ses limites. La culture de cellules tumorales peut en effet amener à des changements dans l'expression génétique et des réarrangements dans la composition de la population cellulaire se traduisant par un modèle de xénogreffe qui ne serait pas en adéquation avec la tumeur originelle¹⁰². De plus, différentes études sur des modèles de xénogreffe testant diverses thérapeutiques ne retrouvaient pas toujours de corrélation en pratique clinique chez l'humain, surtout lorsque les cellules étaient injectées en sous-cutané¹⁰³. L'injection des cellules tumorales en situation orthotopique montre quant à elle une bien meilleure réponse prédictive aux traitements testés, mais l'implantation reste plus difficile techniquement, avec une mortalité animale non négligeable et responsable d'un surcoût expérimental^{103, 104}. Le suivi d'évolution des tumeurs et de l'efficacité des thérapeutiques est aussi plus compliqué du fait de la situation intra-abdominale de la tumeur.

Cette hétérogénéité dans le développement tumoral et la réponse aux traitements pose question quant à la faisabilité à l'avenir de tester des thérapeutiques de manière personnalisée sur modèle animal. Le développement d'un modèle de type culture organotypique pourrait peut être permettre de limiter ces facteurs confondants¹⁰⁵. Le principe consiste à prélever directement de la tumeur du patient à l'état frais lors de la chirurgie, d'en extraire les cellules tumorales et de faire croître une tumeur en sous-cutané chez une souris. Une fois développée, la tumeur est alors prélevée et mise en culture avec ses tissus environnants. Ceci offre l'avantage de développer une matrice mimant la matrice extra-cellulaire dont on connaît le rôle crucial dans la différenciation cellulaire, préservant ainsi les interactions musculo-nerveuses et vasculaires d'une tumeur¹⁰⁵. Il permet à la fois d'observer la tumeur directement sur de longues périodes, de tester des drogues, d'évaluer ses effets secondaires sur les tissus environnants, tout en réalisant des analyses ou prélèvements de manière régulière en fonction du protocole de recherche. En revanche, ce modèle ne prend pas en compte les interactions avec le microenvironnement. De nombreux modèles sphéroïdes 3D de culture organotypique ont été développés dans le glioblastome, le cancer du sein et de l'ovaire, le cholangiocarcinome ou encore le mélanome¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Mais peu de modèles tissulaires d'organoculture ont pu être mis au point pour le moment, et notamment dans le ccRCC.

Conclusion

Ce travail a permis de mettre aux points différents modèles animaux de xénogreffe de ccRCC. La mise au point d'un modèle à partir de lignées primaires est particulièrement intéressant, de par son potentiel unique et propre à chaque patient. L'avenir de nos patients sera probablement d'accéder à un traitement à la carte, en fonction de la réponse de leur tumeur aux différentes thérapeutiques existantes. L'association d'un ARA-2 au sunitinib semble montrer un effet synergique intéressant, augmentant l'efficacité anti-tumorale, notamment dans les formes sarcomatoïdes, en plus de contrôler en partie les effets secondaires (HTA, protéinurie, insuffisance cardiaque) des nouveaux traitements antiangiogéniques. D'autres travaux sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués. Des études cliniques prospectives associant un ARA-2 à un TKI sont également nécessaires pour confirmer ces données chez l'humain.

Bibliographie

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005; **16**(3): 481-8.
2. Motzer RJ. Renal cell carcinoma: a priority malignancy for development and study of novel therapies. *J Clin Oncol.* 2003; **21**(7): 1193-4.
3. Coulange C, Rambeaud J. Les tumeurs du rein de l'adulte. *Epidémiologie. Rapport du 91 ème congrès de l'AFU. Prog Urol.* 1997; **7**(5): 755-62.
4. Verhoest G, Veillard D, Guille F, Taille AD, Salomon L, Abbou CC, et al. Relationship between Age at Diagnosis and Clinicopathologic Features of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2007; **51**(5): 1298-304.
5. Patard JJ, Tazi H, Bensalah K, Rodriguez A, Vincendeau S, Rioux-Leclercq N, et al. The changing evolution of renal tumours: a single center experience over a two-decade period. *Eur Urol.* 2004; **45**(4): 490-3; discussion 3-4.
6. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2006; **176**(6 Pt 1): 2353-8.
7. Patard J-J, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the Importance of Smart Drugs in Renal Cell Carcinoma. *European Urology.* 2006; **49**(4): 633-43.
8. Elson PJ, Witte RS, Trump DL. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1988; **48**(24 Pt 1): 7310-3.
9. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999; **17**(8): 2530-40.
10. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boucher G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005; **23**(4): 832-41.
11. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2009; **27**(34): 5794-9.
12. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993; **260**(5112): 1317-20.
13. Richard S, Beroud C, Joly D, Chretien Y, Benoit G. Von Hippel-Lindau disease and renal cancer: 10 years of genetic progress. GEFVHL (French-Speaking Study Group on von Hippel-Lindau disease). *Prog Urol.* 1998; **8**(3): 330-9.
14. Knudson AG. VHL Gene Mutation and Clear-Cell Renal Carcinomas. *Cancer J Sci Am.* 1995; **1**(3): 180.
15. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 2003; **170**(6 Pt 1): 2163-72.
16. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994; **7**(1): 85-90.
17. Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994; **54**(11): 2852-5.
18. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG, Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**(20): 11661-6.

19. Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene*. 1999; **18**(8): 1529-35.
20. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 2000; **275**(33): 25733-41.
21. Friedrich CA. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001; **10**(7): 763-7.
22. Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG, Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*. 1995; **269**(5229): 1444-6.
23. Aso T, Lane WS, Conaway JW, Conaway RC. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science*. 1995; **269**(5229): 1439-43.
24. Kondo K, Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*. 2001; **264**(1): 117-25.
25. Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res*. 2004; **2**(2): 89-95.
26. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000; **2**(7): 423-7.
27. Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Patard JJ. Voies moléculaires de l'angiogenèse tumorale et nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans le cancer du rein. *Prog Urol*. 2005; **15**(6): 1021-9.
28. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005; **104**(11): 2323-33.
29. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; **246**(4935): 1306-9.
30. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989; **246**(4935): 1309-12.
31. Lange T, Guttman-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*. 2003; **278**(19): 17164-9.
32. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002; **62**(14): 4123-31.
33. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1999; **35**(1): 133-7.
34. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 2004; **64**(21): 7822-35.
35. Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem*. 2003; **278**(26): 23656-65.
36. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*. 1996; **15**(2): 290-98.
37. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*. 1997; **42**(3): 483-8.

38. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J*. 2002; **16**(9): 922-34.
39. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; **376**(6535): 62-6.
40. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, et al. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol*. 1997; **188**(1): 96-109.
41. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 1993; **118**(2): 489-98.
42. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, de Waal RM, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol*. 1998; **153**(2): 395-403.
43. Bando H, Brokelmann M, Toi M, Alitalo K, Sleeman JP, Sipos B, et al. Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int J Cancer*. 2004; **111**(2): 184-91.
44. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999; **13**(1): 9-22.
45. North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett*. 2005; **218**(1): 1-14.
46. Claffey KP, Shih SC, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, et al. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell*. 1998; **9**(2): 469-81.
47. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 1998; **273**(11): 6417-23.
48. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol*. 1998; **18**(6): 3112-9.
49. Bornes S, Boulard M, Hieblot C, Zanibellato C, Iacovoni JS, Prats H, et al. Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J Biol Chem*. 2004; **279**(18): 18717-26.
50. Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol*. 1997; **17**(9): 5629-39.
51. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*. 1996; **271**(5): 2746-53.
52. Datta K, Mondal S, Sinha S, Li J, Wang E, Knebelmann B, et al. Role of elongin-binding domain of von hippel lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005; **24**(53): 7850-8.
53. Fujita J, Kraus MH, Onoue H, Srivastava SK, Ebi Y, Kitamura Y, et al. Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res*. 1988; **48**(18): 5251-5.
54. Uchida T, Wada C, Wang C, Egawa S, Ohtani H, Koshiba K. Genomic instability of microsatellite repeats and mutations of H-, K-, and N-ras, and p53 genes in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1994; **54**(14): 3682-5.
55. Pal S, Datta K, Khosravi-Far R, Mukhopadhyay D. Role of protein kinase Czeta in Ras-mediated transcriptional activation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem*. 2001; **276**(4): 2395-403.

56. Brenner W, Farber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thuroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2002; **99**(1): 53-7.
57. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol*. 2004; **14**(2): 123-30.
58. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009; **373**(9669): 1119-32.
59. Pyrhonen S, Salminen E, Ruutu M, Lehtonen T, Nurmi M, Tammela T, et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol*. 1999; **17**(9): 2859-67.
60. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*. 1992; **3**(2): 65-71.
61. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002; **22**(20): 7004-14.
62. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; **5**(8): 671-88.
63. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; **6**(9): 734-45.
64. Porta C, Paglino C, Imarisio I, Bonomi L. Uncovering Pandora's vase: the growing problem of new toxicities from novel anticancer agents. The case of sorafenib and sunitinib. *Clin Exp Med*. 2007; **7**(4): 127-34.
65. Frangie C, Lefaucheur C, Medioni J, Jacquot C, Hill GS, Nochy D. Renal thrombotic microangiopathy caused by anti-VEGF-antibody treatment for metastatic renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2007; **8**(2): 177-8.
66. Khurana A. Allergic interstitial nephritis possibly related to sunitinib use. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2007; **5**(4): 341-4.
67. Bollee G, Patey N, Cazajous G, Robert C, Goujon JM, Fakhouri F, et al. Thrombotic microangiopathy secondary to VEGF pathway inhibition by sunitinib. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; **24**(2): 682-5.
68. Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet*. 2007; **370**(9604): 2011-9.
69. Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, Gray CE, Hall P, Sugimoto H, et al. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; **22**(4): 1136-43.
70. Vigneau C, Lorcy N, Dolley-Hitze T, Jouan F, Arlot-Bonnemains Y, Laguerre B, et al. All anti-vascular endothelial growth factor drugs can induce 'pre-eclampsia-like syndrome': a RARE study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; **29**(2): 325-32.
71. Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling. *J Gastrointest Surg*. 2008; **12**(1): 57-66.
72. Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, et al. Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2008; **109**(3): 418-25.
73. Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY, Simon DI, Fang JC. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2010; **11**(7): 627-36.
74. Meredith PA, McInnes GT. Angiotensin-receptor blockade, cancer, and concerns. *Lancet Oncol*. 2010; **11**(9): 819; author reply 21-2.

75. Sipahi I, Chou J, Mishra P, Debanne SM, Simon DI, Fang JC. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cancer risk. *Am J Cardiol.* 2011; **108**(2): 294-301.
76. Effects of telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, and losartan on cancers in 15 trials enrolling 138,769 individuals. *J Hypertens.* 2011; **29**(4): 623-35.
77. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet.* 1998; **352**(9123): 179-84.
78. Huang CC, Chan WL, Chen YC, Chen TJ, Lin SJ, Chen JW, et al. Angiotensin II receptor blockers and risk of cancer in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 2011; **107**(7): 1028-33.
79. Chang CH, Lin JW, Wu LC, Lai MS. Angiotensin receptor blockade and risk of cancer in type 2 diabetes mellitus: a nationwide case-control study. *J Clin Oncol.* 2011; **29**(22): 3001-7.
80. Pasternak B, Svanstrom H, Callreus T, Melbye M, Hviid A. Use of angiotensin receptor blockers and the risk of cancer. *Circulation.* 2011; **123**(16): 1729-36.
81. Wilop S, von Hobe S, Crysandt M, Esser A, Osieka R, Jost E. Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; **135**(10): 1429-35.
82. Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: A retrospective examination. *Eur J Cancer.* 2011; **47**(13): 1955-61.
83. Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Fukui N, Komai Y, Saito K, et al. Favorable response to combination treatment of cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin system inhibitor in metastatic renal cell carcinoma: Report of three cases. *Int J Urol.* 2008; **15**(9): 848-50.
84. Chae YK, Valsecchi ME, Kim J, Bianchi AL, Khemasuwan D, Desai A, et al. Reduced risk of breast cancer recurrence in patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins. *Cancer Invest.* 2011; **29**(9): 585-93.
85. Dagher J, Dugay F, Verhoest G, Cabillic F, Jaillard S, Henry C, et al. Histologic prognostic factors associated with chromosomal imbalances in a contemporary series of 89 clear cell renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2013; **44**(10): 2106-15.
86. Vegrn F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2011; **71**(7): 2550-60.
87. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; **7**(1): 11-20.
88. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics.* 2010; **10**(9): 1886-90.
89. Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Oliveira E, Rubio-Viqueira B, et al. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011; **10**(8): 1311-6.
90. Pagliaro LC, Tannir N, Sircar K, Jonasch E. Systemic therapy for sarcomatoid renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* **11**(6): 913-20.
91. Dolley-Hitze T, Verhoest G, Jouan F, Le Pogamp P, Arlot-Bonnemains Y, Oger E, et al. Angiotensin-2 type 1 receptors (AT1R) and cancers. *Nephrol Ther.* 2013; **9**(2): 85-91.
92. Abd-Alhaseeb MM, Zaitone SA, Abou-El-Ela SH, Moustafa YM. Olmesartan Potentiates the Anti-Angiogenic Effect of Sorafenib in Mice Bearing Ehrlich's Ascites Carcinoma: Role of Angiotensin (1-7). *PLoS One.* 2014; **9**(1): e85891.

93. Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther.* 2003; **2**(11): 1139-47.
94. Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; **12**(9): 2888-93.
95. Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2002; **62**(15): 4176-9.
96. Dolley-Hitze T, Verhoest G, Jouan F, Le Pogamp P, Arlot-Bonnemains Y, Oger E, et al. Angiotensin-2 type 1 receptors (AT1R) and cancers. *Nephrol Ther.* 2013; **9**(2): 85-91.
97. Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *Eur J Cancer.* 2011; **47**(13): 1955-61.
98. Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer.* 2010; **103**(11): 1698-705.
99. Yuge K, Miyajima A, Tanaka N, Shirotake S, Kosaka T, Kikuchi E, et al. Prognostic value of renin-angiotensin system blockade in non-muscle-invasive bladder cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; **19**(12): 3987-93.
100. Moro M, Bertolini G, Tortoreto M, Pastorino U, Sozzi G, Roz L. Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012; **2012**: 568567.
101. Giovanella BC, Vardeman DM, Williams LJ, Taylor DJ, de Ipolyi PD, Greeff PJ, et al. Heterotransplantation of human breast carcinomas in nude mice. Correlation between successful heterotransplants, poor prognosis and amplification of the HER-2/neu oncogene. *Int J Cancer.* 1991; **47**(1): 66-71.
102. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res.* 2009; **69**(8): 3364-73.
103. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther.* 2003; **2**(4 Suppl 1): S134-9.
104. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer.* 2001; **84**(10): 1424-31.
105. Vaira V, Fedele G, Pyne S, Fasoli E, Zadra G, Bailey D, et al. Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; **107**(18): 8352-6.
106. Merz F, Gaunitz F, Dehghani F, Renner C, Meixensberger J, Gutenberg A, et al. Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro Oncol.* 2013; **15**(6): 670-81.
107. Campbell DJ, Dumur CI, Lamour NF, Dewitt JL, Sirica AE. Novel organotypic culture model of cholangiocarcinoma progression. *Hepatol Res.* 2012; **42**(11): 1119-30.
108. Vorsmann H, Groeber F, Walles H, Busch S, Beisert S, Walczak H, et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. *Cell Death Dis.* 2013; **4**: e719.

ANNEXES

Autres travaux en rapport avec la thèse

Verhoest G, Dolley-Hitze T, Jouan F, Bensalah K, Belaud-Rotureau MA, Rioux-Leclercq N, et al.

Efficacité des antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II en association aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans un modèle murin de xénogreffe de carcinome rénal à cellules claires.

Communication orale au congrès de l'Association Française d'Urologie, Paris, Novembre 2011

Dolley-Hitze T, **Verhoest G**, Jouan F, Arlot-Bonnemains Y, Lavenue A, Belaud-Rotureau MA, et al.

Telmisartan potentiates the antiangiogenic effects of sunitinib in murine xenograft model of renal cell carcinoma.

Communication orale au congrès de l'American Society of Nephrology, 2011.

Dolley-Hitze T, **Verhoest G**, Jouan F, Le Pogamp P, Arlot-Bonnemains Y, Oger E, et al.

Récepteurs de type 1 à l'angiotensine-2 (AT1R) et cancers.

Nephrol Ther 2013;9: 85-91.

Financements

Fonds de Recherche de l'AFU (Association Française d'Urologie)

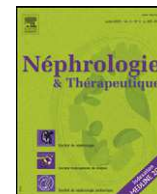
Université Rennes 1

Région Bretagne



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Revue générale/Mise au point

Récepteurs de type 1 à l'angiotensine-2 (AT1R) et cancers

Angiotensin-2 type 1 receptors (AT1R) and cancers

Thibault Dolley-Hitze^{a,b}, Grégory Verhoest^{b,c}, Florence Jouan^b, Patrick Le Pogamp^a,
Yannick Arlot-Bonnemains^b, Emmanuel Oger^d, Marc-Antoine Belaud-Rotureau^{b,e},
Nathalie Rioux-Leclercq^{b,f}, Cécile Vigneau^{a,*,b}

^a Service de néphrologie, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^b CNRS UMR 6290/Biosit, faculté de médecine, université Rennes-1, 2, avenue du Professeur-Léon-Bernard, CS34317, 35043 Rennes cedex, France

^c Service d'urologie, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^d Service de pharmacologie clinique, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^e Service de cytogénétique, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

^f Service d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU Pontchaillou, 2, rue Henri-Le-Guilloux, 35033 Rennes, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 11 juin 2012

Accepté le 17 septembre 2012

Mots clés :

Angiotensine-2

AT1R

Antagonistes des récepteurs à

l'angiotensine-2

Inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Cancer

R É S U M É

Plusieurs méta-analyses récentes nous ont alertés sur la possibilité d'un sur-risque tumoral pour les patients recevant des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine-2 (ARA-2). Nous avons souhaité poursuivre cette réflexion en reprenant aussi bien les données épidémiologiques que celles issues de recherches fondamentales. Les données épidémiologiques, souvent discordantes entre elles, sont soit grevées de nombreux biais, soit uniquement rétrospectives. De plus, les méta-analyses sont toutes issues d'études à visée cardiovasculaire dont l'analyse du risque tumoral était le plus souvent absente. Seul un recueil prospectif et spécifique pourrait apporter des preuves plus fiables. A contrario, toutes les données issues de recherches expérimentales concordent et montrent un puissant rôle antitumoral des ARA-2 et à un moindre degré des IEC. Les principaux mécanismes décrits à partir de modèles cellulaires ou d'expérimentations animales sont une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale et de la néo-angiogenèse. Aux vues des mécanismes impliqués, l'efficacité de certaines thérapeutiques conventionnelles anticancéreuses pourrait être améliorée par l'association aux ARA-2 et aux IEC. Dans un proche avenir, des applications cliniques pourraient être développées.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Association Société de néphrologie.

A B S T R A C T

Recently, several meta-analysis suggested an increased risk of cancers linked to the use of antagonists of angiotensin-2 receptors or inhibitors of angiotensinogen converting enzyme. The results of epidemiological studies are conflicting. Meta-analysis as well as retrospective studies are not reliable and biased, since they have never been designed to explore any pro- or antitumoral effect. We lack of prospective studies that could take off the doubt on these drugs. Nevertheless, all experimental researches pointed out potent antitumoral properties. Indeed, direct antiproliferative and neo-angiogenic inhibition have been described on tumor cell cultures as well as on animal models. Moreover, we are convinced that the use of antagonists of angiotensin-2 receptors and inhibitors of angiotensinogen converting enzyme may be then of clinical use in the near future in association with classical antitumor drugs. In this review, we proposed to explore these data by a thorough analysis of recent literature associating epidemiological and experimental studies.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of the Association Société de néphrologie.

Keywords:

Angiotensin-2

AT1R

Antagonists of angiotensin-2 receptors

Inhibitors of angiotensinogen converting enzyme

Cancer

1. Abréviations

ARA-2 antagonistes des récepteurs de l'angiotensine-2
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : cecile.vigneau@chu-rennes.fr (C. Vigneau).

ECA	enzyme de conversion de l'angiotensinogène
Erk1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
LH-RH	hormone de libération de la lutéinostimuline
HTA	hypertension artérielle
IEC	inhibiteurs de l'enzyme de conversion
JAK	Jun Activating Kinase
NF-κB	Nuclear Factor-κB
PAX2	Paired Homebox 2
PI3-kinase	Phosphoinositide kinase
AT1R	récepteurs de type-1 à l'angiotensine-2
AT2R	récepteurs de type-2 à l'angiotensine-2
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SRA	système rénine-angiotensine
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

2. Introduction

Depuis quelques mois, une controverse agite la littérature médicale sur le rôle que pourrait jouer l'utilisation des ARA-2 et des IEC sur l'incidence des cancers. Nous avons donc souhaité faire le point sur cette question non seulement à partir des données cliniques mais aussi de recherche fondamentale disponibles début 2012.

Les données épidémiologiques actuelles et l'analyse post-hoc de grandes études, qui ont conduit à un recours en première intention aux bloqueurs du SRA dans les maladies cardiovasculaires et néphrologiques, sont contradictoires quant à l'influence de ces traitements sur la survenue des cancers. Au travers d'une analyse critique, seront présentés les travaux les plus pertinents.

Les données de la recherche fondamentale sont, quant à elles, toutes concordantes et montrent un rôle antitumoral des bloqueurs du SRA. Les mécanismes impliqués sont principalement un blocage de la prolifération cellulaire tumorale et une inhibition de la néo-angiogenèse. Il nous a semblé important de détailler les liens physiopathologiques entre carcinogenèse et SRA afin de conforter l'hypothèse d'un rôle protecteur et antitumoral des IEC et des ARA-2.

3. Données issues des études cliniques

3.1. Méta-analyses

Une large méta-analyse avec analyse post-hoc parue dans *Lancet Oncology* en juillet 2010 a ouvert le débat actuel en discréditant l'utilisation des ARA-2 [1] (Tableau 1). Ce travail répertorie les principales études cliniques parues avant novembre 2009, portant sur l'emploi des ARA-2 et incluant au moins 100 patients.

L'incidence des cancers (68 402 patients issus de cinq études : Life, Trophy, Transcend, Ontarget et Profess) et des décès par cancer en fonction de l'utilisation ou non d'ARA-2 (93 515 patients issus des cinq études précédentes et de trois supplémentaires : Optimaal, Valiant et Val-Heft) ont été étudiés. D'après ce travail, l'incidence des cancers est significativement augmentée mais la mortalité spécifique par cancer n'est pas modifiée. De nombreux biais modèrent cependant les résultats de cette analyse et ont été exposés dans des lettres de réponse [2]. Tout d'abord, il s'agit d'analyses post-hoc, pour lesquelles le risque tumoral n'était jamais l'objectif principal et rarement un objectif secondaire. Pour certaines, les données concernant la survenue de cancers ont été

Tableau 1

Résumé des principales études épidémiologiques et des études cliniques sur le lien entre risque tumoral et utilisation des bloqueurs du système rénine-angiotensine (SRA).

Méta-analyses	Traitements étudiés	Nombre de patients	Biais méthodologiques	Conclusions
Sipahi I (2010)	Sartans	93 515	Groupes témoins non homogènes Recueil non exhaustif des cancers et des FDR de cancer Objectif principal = événements cardiovasculaires Durée de suivi trop courte (3,5 ans en moyenne)	Augmentation de l'incidence des cancers Mortalité spécifique par cancer identique
Sipahi I (2011)	Sartans et IEC	61 714	Bonne homogénéité des groupes témoins Biais idem ci-dessus	Pas d'augmentation d'incidence des cancers Mortalité identique
ARB trialists (2011)	Sartans	138 769	Biais idem ci-dessus	Pas d'augmentation d'incidence des cancers
Études de registre	Traitements étudiés	Nombre de patients	Durée moyenne de suivi (ans)	Conclusions
Lever AF (1998)	IEC vs hypotenseurs (sauf sartans)	5207	6,6	Rôle protecteur des IEC
Huang CC (2011)	Sartans vs hypotenseurs (sauf IEC)	109 002	5,7	Rôle protecteur des sartans
Chang CH (2011)	Étude cas-témoin issue de l'étude de Huang CC (comparaison patients atteints de cancers vs indemnes)	Idem	Idem	Absence de risque des sartans
Pasternak B (2011)	IEC vs sartan	425 285	2,2	Risque identique des IEC et des sartans
Études rétrospectives	Traitements étudiés	Nombre de patients	Type de cancer	Conclusions
Wilop S (2009)	IEC ou sartans vs aucun bloqueur du SRA	287	Cancers bronchiques	Survie globale augmentée de 3,1 mois
Keizman D (2011)	IEC ou sartans vs aucun bloqueur du SRA	127	Carcinomes rénaux à cellules claires	Meilleure réponse au traitement Survie sans progression augmentée
Chae YK (2011)	IEC ou sartans vs aucun bloqueur du SRA	703	Cancers du sein	Diminution des récidives

récupérées secondairement. Les auteurs n'ont parfois pas été contactés pour la récupération des données ce qui interroge sur l'exactitude et l'exhaustivité des données analysées. De plus, la durée de suivi, en moyenne 3,5 années et n'excédant jamais cinq années, a souvent été trop courte pour que les événements néoplasiques apparaissent en nombre suffisant pour être analysables. Les groupes témoins de ces différentes études n'étaient pas homogènes et ont aussi bien pu recevoir un placebo (Transcend), un bêtabloquant (Life), un IEC (Optimaal et Valiant) ou l'association d'un IEC et d'un ARA-2 (Profess). Enfin et le plus souvent, l'exposition des individus aux autres facteurs de risque de cancer, tel que par exemple le tabac, n'était pas mentionnée. De nombreux biais peuvent donc être soulevés et remettre en question les conclusions de cette première méta-analyse.

Suite aux nombreuses critiques méthodologiques parues dans la littérature, les auteurs de ce travail ont repris leur étude [3]. Des études plus anciennes (à partir de 1950) et publiées jusqu'en 2010 ont été prises en compte pour cette seconde méta-analyse avec la nécessité d'un suivi théoriquement plus long et supérieur à un an. Les études avec un groupe témoin placebo ont été distinguées de même que l'utilisation d'ARA-2 ou d'IEC en monothérapie ou en association. Enfin, les auteurs ont voulu étendre leurs analyses à toutes les classes thérapeutiques antihypertensives. Par conséquent, des études complémentaires ont été analysées dans ce travail, incluant ainsi plus de 300 000 patients. Parmi les ARA-2, le telmisartan a été distingué des autres ARA-2, de même que les IEC à faible affinité tissulaire et ceux à forte affinité. Que ce soit pour les ARA-2 ou pour les IEC, en analyse globale ou de sous-groupe, aucune augmentation du risque de survenue de cancer et aucune augmentation de la mortalité par cancer n'est mise en évidence contrairement aux conclusions établies dans le premier article. L'analyse des associations IEC-ARA-2 n'a pas pu conclure en raison du trop faible nombre de patients. Même si la méthodologie de cette seconde méta-analyse a été plus rigoureuse, demeurent toujours les problèmes relatifs à la durée de suivi, à l'exhaustivité du recueil des données concernant la survenue des cancers et l'exposition aux facteurs de risque classiques de cancer.

Dans une troisième méta-analyse parue dans *Journal of Hypertension* en 2011 [4], les auteurs n'ont repris que les études portant sur l'utilisation des ARA-2. La méthodologie est superposable à celle utilisée dans le second article de Sipahi et près de 140 000 patients ont été inclus. Aucune augmentation du risque de survenue de cancer n'a été mise en évidence. Les mêmes biais mentionnés pour les deux premières méta-analyses demeurent.

3.2. Études de registres

Les études de registres apportent des conclusions différentes de celles des méta-analyses, mentionnant même un potentiel rôle protecteur des ARA-2 dans la survenue des cancers !

Dès 1998, la question du lien entre l'utilisation des IEC et le risque de cancers avait été posée par Lever, dans un travail publié dans *Le Lancet* [5]. Dans un centre spécialisé dans l'HTA à Glasgow, à partir de 5207 dossiers analysés entre 1980 et 1995, 4930 patients ont reçu un traitement pharmacologique de l'HTA dont 1559 des IEC. L'incidence des cancers des patients recevant des IEC a été comparée à celle des patients recevant un autre traitement antihypertenseur ou pas de traitement. La durée moyenne de suivi pour les 5207 patients était de 6,6 ans, de 5,2 années dans le groupe IEC et de 7,2 années pour le groupe des autres molécules antihypertensives. L'exposition au tabac a été recueillie pour plus de 98 % des patients inclus. Un appariement a été effectué sur l'âge et le sexe des patients. Les courbes de survie (Kaplan-Meier) mettent en évidence un rôle protecteur des IEC par rapport aux autres molécules antihypertensives. Analysés séparément, les

inhibiteurs calciques, les bêtabloquants ou les diurétiques n'ont aucun rôle sur le risque de cancer. Les IEC sembleraient protéger plus efficacement contre l'apparition des cancers pulmonaires et mammaires, plus particulièrement chez les femmes et les fumeurs. Cependant, le principal biais de cette étude réside dans la différence de durée de suivi entre les patients ayant reçu des IEC et les patients ayant reçu d'autres médicaments, ce qui peut favoriser les IEC même si les courbes de survie se séparent précocement. Par ailleurs, cette étude ancienne a été réalisée avec des molécules dont l'activité et l'efficacité diffèrent des molécules actuellement prescrites et utilisées.

Une étude de registre d'assurance taïwanaise [6] publiée en 2011, plus rigoureuse du point de vue méthodologique, semble confirmer les conclusions de Lever. Cette base de données comporte un million de taïwanais depuis le 1^{er} janvier 1998. Parmi ces personnes, presque 110 000 ont été nouvellement diagnostiqués pour une HTA et un peu plus de 40 000 ont reçu des ARA-2. Les patients hypertendus recevant des ARA-2 ont été comparés aux autres patients hypertendus traités. La durée moyenne de suivi était de $5,7 \pm 2,6$ ans. Les patients recevant des ARA-2 étaient un peu plus âgés : 59,3 ans versus 57,9 ans pour les patients non traités, plus souvent diabétiques et insuffisants rénaux chroniques ou nécessitant le recours des associations de molécules antihypertensives pour contrôler leur HTA. L'analyse de cette cohorte met en évidence que les ARA-2 diminuent significativement l'incidence des cancers. Cet effet est plus marqué chez les patients âgés et si l'exposition aux ARA-2 est prolongée plus d'un an. Tous les ARA-2 étudiés semblent avoir le même pouvoir protecteur. La protection semble équivalente, quel que soit le type de cancer pris en compte. Des biais inhérents à ce type d'étude sont présents, le principal étant l'absence de distinction entre les IEC et les autres médicaments antihypertenseurs dans le groupe témoins.

À partir de ce même registre mais uniquement sur la population diabétique hypertendue, une étude cas-témoin a été réalisée afin de rechercher un lien entre survenue de cancer et utilisation des ARA-2 [7]. Aucune augmentation du risque n'est montrée dans ce travail.

Enfin, une étude réalisée à partir d'un registre danois incluant plus de 400 000 patients a été publiée en avril 2011 [8]. Le but de ce travail a été de comparer la survenue de cancers en fonction de l'utilisation des ARA-2 ou des IEC. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre ces deux types de molécules.

Ces données, issues des grandes études cardiovasculaires et des registres, sont contradictoires et ne permettent pas de conclure. Seul un essai prospectif à grande échelle pour laquelle l'incidence des cancers serait l'objectif principal pourrait nous aider mais n'a pour le moment jamais été réalisé.

3.3. Études rétrospectives

Quelques études rétrospectives à partir de séries de patients atteints de tumeurs ont été publiées récemment et mettent en évidence un intérêt pour les IEC et les ARA-2. En effet, dans ces études, ces classes thérapeutiques amélioreraient le pronostic des patients.

La survie de 287 patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules, localement avancé ou métastatique, traités entre 1996 et 2007 et provenant d'un seul centre allemand a été analysée en fonction de l'utilisation à visée antihypertensive ou non d'IEC ou d'ARA-2 [9]. Parmi ces patients, 52 ont reçu un IEC ou un ARA-2. L'utilisation d'une de ces deux classes thérapeutiques améliore de 3,1 mois la survie globale médiane (11,7 mois versus 8,6 mois). Cet effet est indépendant des doses de sels de platine reçues ou de l'exposition aux facteurs de risque classiques.

Des résultats comparables ont été décrits plus récemment dans une série de carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques

traités par sunitinib entre 2004 et 2010 [10]. Parmi les 127 patients étudiés rétrospectivement, 44 ont reçu soit un IEC, soit un ARA-2 et 83 aucune de ses deux classes thérapeutiques. Les patients traités par un bloqueur du SRA ont une meilleure réponse au traitement et une survie sans progression améliorée. Pour ce même type de tumeur, une publication rapportant trois cas mentionne que l'association de la cimetidine avec des IEC ou des ARA-2 semble bénéfique [11].

Enfin, il a été montré que des patientes suivies pour des cancers du sein agressifs récidivent moins si elles reçoivent des IEC ou des ARA-2 [12].

Ces articles indiquent donc que l'utilisation de bloqueurs du SRA pourrait améliorer la réponse au traitement, la survie et diminuer le risque de récurrence des patients en cours de traitement pour un cancer. En outre, ces conclusions sont appuyées par de nombreux travaux de recherche fondamentale sur la biologie des cancers.

4. Données issues de la recherche expérimentale

4.1. Polymorphisme des gènes du système rénine-angiotensine et susceptibilité aux cancers

Le lien entre polymorphisme des gènes du système rénine-angiotensine et risque de cancer a souvent été étudié. La plupart des publications porte sur le génotype Insertion/Délétion (I/D) de l'ECA [13]. Le variant génotypique D est en effet connu pour induire une concentration plus importante en ECA circulante avec un impact « pro-inflammatoire ». Sa présence est donc supposée être associée à un risque accru de cancer. Cependant, des méta-analyses récentes mettent en évidence des résultats contradictoires qui ne permettent pas de conclure sur un rôle dans le risque de survenue de cancer, global ou spécifique d'organe [14].

Des travaux plus récents, utilisant des technologies de haute résolution, ont permis d'explorer des variations génétiques plus spécifiques. Ainsi, concernant les carcinomes rénaux à cellules claires, l'analyse par « single nucleotide polymorphism » met en évidence que certaines variations présentes dans la région promotrice de l'angiotensinogène sont corrélées à un sur-risque de cancer. La présence de polymorphismes des gènes de l'angiotensinogène et d'AT1R est aussi associée à une augmentation de risque dans le cancer du sein [15]. Suite à ces travaux, il serait intéressant d'explorer l'impact des polymorphismes géniques évoqués en termes de perte ou de gain de fonction pour des protéines transcrites et de leur impact dans les mécanismes de cancérogenèse.

4.2. Expression des récepteurs à l'angiotensine-2 par les tissus tumoraux

Les différents composants du SRA jouent un rôle important dans l'embryogenèse et le développement des différents organes, en particulier des reins [16]. À l'âge adulte, de nombreux tissus de l'organisme expriment tout ou partie des composants de la cascade d'activation du SRA, comme le cerveau [17], les poumons [18], le cœur [19], le foie [20], le pancréas [21] ou les reins [22].

De nombreux composants du SRA sont exprimés à forte concentration dans les tissus tumoraux. Ainsi, les tumeurs gliales de haut grade expriment presque tous les composants du SRA : l'angiotensinogène, la rénine et son récepteur, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, AT1R et AT2R [23]. La cascade enzymatique est donc activable et peut fonctionner localement de manière autonome.

De plus, il semble exister un lien entre agressivité tumorale et niveau d'expression d'AT1R. En effet, plus AT1R est exprimé au sein d'une tumeur, plus l'agressivité tumorale est importante en

relation et le pronostic défavorable. Nous avons récemment montré cette relation dans les carcinomes rénaux à cellules claires [24]. Dans notre série de 84 tumeurs, les tumeurs les plus agressives, histologiquement définies par un score de Fuhrman à 4, l'expression d'AT1R évaluée par immunohistochimie et Western Blot est augmentée. Cette surexpression est associée à une moins bonne survie sans progression des patients. Des résultats similaires ont été obtenus pour de nombreux autres cancers : tumeurs mammaires de type carcinomes canalaux infiltrants exprimant les récepteurs aux estrogènes [25], tumeurs gastriques [26], carcinomes épidermoïdes de vessie [27], astrocytomes [28], glioblastomes [23], tumeurs ovariennes [29], carcinomes spino-cellulaires de la peau [30], adénocarcinomes pancréatiques [31], tumeurs surrénaliennes [32], cancer de l'ovaire [33], cancer gastrique [34], tumeurs du col de l'utérus [35].

En parallèle, la surexpression d'AT2R n'est observée que pour certaines tumeurs agressives comme les glioblastomes [28], les carcinomes rénaux à cellules claires [24] et les cancers gastriques [34].

4.3. Rôle de l'angiotensine-2 et du blocage de ses récepteurs dans la progression tumorale

De nombreux modèles expérimentaux, tant cellulaires que murins, apportent les preuves d'une implication de l'angiotensine-2 dans les mécanismes de progression tumorale (Fig. 1). Ce rôle « pro-tumoral » est principalement médié par l'activation d'AT1R.

L'angiotensine-2 peut induire l'expression du VEGF et donc favoriser la néo-angiogenèse au sein de nombreuses tumeurs : pancréas [36] ou vessie [37]. L'angiotensine-2 induit également de la prolifération cellulaire via l'activation de plusieurs cascades moléculaires : la voie PI3-kinase/Akt, décrit dans un modèle cellulaire de cancer du sein [38], la voie NF- κ B mentionnée dans les tumeurs gastriques [26], la voie PAX2 STAT3 JAK observée dans des tumeurs prostatiques [39] et enfin la voie de l'EGFR après transactivation du récepteur par AT1R et Erk1/2. Cette dernière a été observée dans divers modèles cellulaires endothéliaux [40], de tumeurs mammaires [41] et également des tumeurs prostatiques [42]. Enfin, l'angiotensine-2 via AT1R peut aussi inhiber certaines voies de l'apoptose de cellules tumorales [43].

Dans de nombreux modèles expérimentaux, le blocage de la fixation de l'angiotensine-2 à AT1R par un ARA-2 développe une action antitumorale. L'un des principaux mécanismes évoqué est l'inhibition de la néo-angiogenèse par diminution de la sécrétion du VEGF par les cellules tumorales. Ce facteur de croissance est essentiel à la néovascularisation au sein des tumeurs et donc à la

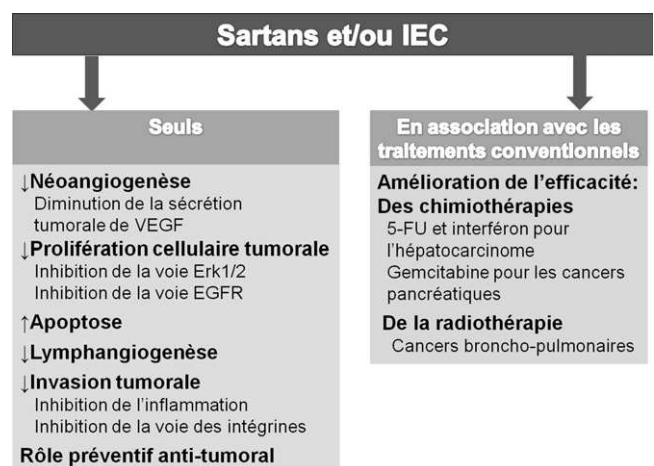


Fig. 1. Résumé des principales données expérimentales montrant un rôle antitumoral des bloqueurs du système rénine-angiotensine (SRA).

croissance tumorale. Il a été montré que la production VEGF par différents types de cellules tumorales : cellules de cancer du pancréas [36], cellules de cancer du sein [44], cellules de cancer prostatique hormono-résistant [45], cellules de cancer pancréatique [46], diminue sous l'action des ARA-2. L'utilisation des ARA2 sur des modèles tumoraux chez la souris conduit in fine à une nette inhibition de la croissance tumorale [47].

Les ARA-2 inhibent aussi directement la prolifération cellulaire au sein de nombreux types de tumeurs comme les ostéosarcomes [48], les carcinomes prostatiques [49], les mélanomes [50] ou les cancers mammaires [51]. Des effets similaires ont été décrits pour l'utilisation des IEC sur les carcinomes rénaux à cellules claires [52]. Les mécanismes font intervenir l'activation de la voie Erk 1/2 et la transactivation d'EGFR.

Parmi les autres mécanismes antitumoraux des ARA-2, il est mis en évidence que :

- les ARA-2 diminuent la lymphangiogenèse dans un modèle murin [53] ;
- les ARA-2 induisent l'apoptose de certaines cellules tumorales telles que les tumeurs pancréatiques [54] ;
- les ARA-2 peuvent limiter l'activation de la voie TGF- β dans un modèle murin de cancer pancréatique [55] ;
- les ARA-2 ou les IEC limitent les conséquences du stress oxydant induit par l'angiotensine-2 dans un modèle cellulaire de cancer prostatique [56] et inhibent l'inflammation locale [57] ainsi que l'invasion tumorale locale [58] ;
- différents modèles murins tumoraux mettent en évidence que l'utilisation des IEC et des ARA-2 limite la croissance tumorale et la progression métastatique des cancers colorectaux [59] et des carcinomes rénaux à cellules claires [60]. Cet effet semble être lié à la régulation des intégrines comme montré dans un modèle cellulaire de cancer du sein [61] ;
- l'utilisation d'IEC permet aussi de prévenir l'apparition de cancers de prostate (modèle murin de souris transgéniques) [62].

Une question reste actuellement en suspens : bloquer AT1R ne pourrait-il pas favoriser la stimulation d'AT2R et ainsi avoir un effet délétère sur la maladie tumorale ?

Dans des modèles physiologiques, AT2R intervient pour s'opposer aux effets d'AT1R, comme par exemple sur l'expression des protéines du diaphragme de fente [63]. Au sein des tumeurs, le rôle d'AT2R reste plus ambigu et il semblerait exister une spécificité d'action dépendante du type de cancer. Ces résultats sont à pondérer par le faible nombre de travaux réalisés sur les liens entre AT2R et les mécanismes de cancérogenèse. Comme mentionné, seules quelques tumeurs agressives semblent surexprimer AT2R. Un travail récent, réalisé sur un modèle murin de cancer bronchopulmonaire, suggère un rôle antitumoral d'AT2R [64]. Dans cette étude, l'administration intratrachéale de nanoparticules porteuses d'AT2R réduit significativement la croissance tumorale. Les mécanismes d'action AT2R et « d'interactions » entre AT1R et AT2R devront donc être étudiés de manière plus systématique dans différents types de cancers mais également d'un point de vue mécanistique. Définir le rôle d'AT2R et la relation croisée AT1R–AT2R dans la croissance tumorale serait une avancée considérable dans l'initiation de stratégies thérapeutiques ciblées.

5. Perspectives

5.1. Rôle préventif des bloqueurs du SRA ?

Aux vues du nombre de prescriptions d'ARA-2 et d'IEC, en particulier en néphrologie et chez des patients parfois très jeunes, il est licite de s'interroger autrement sur cette classe thérapeutique : augmente-t-elle le risque de survenue de cancer ou au contraire

confère-t-elle une forme de protection ? Les données actuelles issues des études de registres et des grandes méta-analyses sont contradictoires et discutables dans leur méthodologie. Il est cependant peu probable que des études prospectives soient menées dans un avenir proche. Peut-être pouvons-nous nous référer aux résultats expérimentaux qui suggèrent que les ARA-2 et les IEC inhibent la progression tumorale. Il serait donc tentant de conclure que les bloqueurs du SRA pourraient ne pas induire un risque accru de survenue de cancers mais le prévenir.

La même question se pose avec les inhibiteurs de la rénine. Aucune donnée épidémiologique n'est actuellement disponible mais quelques travaux expérimentaux semblent montrer un rôle antiangiogénique de cette nouvelle classe thérapeutique [65].

5.2. Place clinique des bloqueurs du SRA comme thérapeutique anti-tumorale

Toutes les données expérimentales convergent vers les mêmes conclusions. Les bloqueurs d'AT1R mais aussi les IEC auraient une action antitumorale via une inhibition de la prolifération cellulaire et de la néo-angiogenèse ainsi qu'une induction de l'apoptose des cellules tumorales. Les quelques données rétrospectives issues de séries de patients porteurs de tumeurs et ayant reçu ou non des ARA-2 ou des IEC suggèrent que les bloqueurs du SRA pourraient avoir un intérêt dans le traitement de nombreuses tumeurs en complément des chimiothérapies anticancéreuses.

Avant de débiter des essais thérapeutiques, il reste à rechercher quelles associations seraient les plus pertinentes. La réponse dépendra en premier lieu du type de cancer. Il a déjà été décrit dans un modèle murin de xénogreffe d'adénocarcinome pulmonaire, que l'utilisation d'IEC augmente l'efficacité de la radiothérapie [66]. Des effets bénéfiques similaires ont été observés dans des modèles murins d'hépatocarcinome lors de l'association d'IEC avec du 5-fluorouracil [67] ou d'IEC avec un interféron- β [68]. La combinatoire : gemcitabine associée à un ARA-2 a permis d'obtenir la même efficacité [69]. Enfin, dans une cohorte de 23 patients porteurs de cancers prostatiques hormono-résistants, l'association du candesartan à un antiandrogénique analogue de l'RH-LH a permis une diminution des PSA ainsi qu'une amélioration clinique discrète [70].

Les ARA-2 pourraient être associés avec les nouvelles molécules antiangiogéniques inhibitrices des tyrosines kinases pour une meilleure efficacité thérapeutique. La pertinence de cette association est étayée par le fait que les ARA-2 peuvent inhiber la sécrétion de VEGF (cf. ci-dessus) et les inhibiteurs des tyrosines kinases ont pour cible principale l'inhibition des récepteurs au VEGF. Cette hypothèse est également renforcée par le fait que les antiangiogéniques induisent une surexpression d'AT1R par les cellules tumorales [71] et inhibent la voie de signalisation de l'EGF tout comme les ARA-2 [42].

Il reste à préciser quelles tumeurs répondraient le mieux à l'utilisation d'ARA-2. S'agit-il de tumeurs surexprimant le plus les récepteurs de type AT1R, par analogie aux récepteurs aux estrogènes des tumeurs mammaires ? Aucune donnée ne nous permet actuellement d'apporter une réponse.

6. Conclusion

Même si la question a beaucoup été débattue ces derniers mois, les différentes études publiées ne permettent pas de conclure à une augmentation du risque de cancers pour les patients recevant un bloqueur du SRA. A contrario, les données expérimentales concordent pour montrer un rôle thérapeutique anticancéreux des ARA-2 et des IEC. Leur place pour une utilisation clinique en association avec les thérapeutiques anticancéreuses classiques reste à définir.

Déclaration d'intérêts

Communication orale rémunérée pour un symposium régional Amgen. Invitation aux congrès régionaux, nationaux et internationaux par les laboratoires Amgen, Novartis et Roche. Don de sunitinib par le laboratoire Pfizer pour des travaux de recherche expérimentale.

Remerciements

Remerciements à la région Bretagne, l'université Rennes-1, l'Association française d'urologie (AFU) et le laboratoire Pfizer pour leur soutien financier.

Références

- [1] Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY, Simon DI, Fang JC. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2010;11:627–36.
- [2] Meredith PA, McInnes GT. Angiotensin-receptor blockade, cancer, and concerns. *Lancet Oncol* 2010;11:819 [author reply 812–821].
- [3] Sipahi I, Chou J, Mishra P, Debanne SM, Simon DI, Fang JC. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cancer risk. *Am J Cardiol* 2011;108:294–301.
- [4] The ARB trialists collaboration. Effects of telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, and losartan on cancers in 15 trials enrolling 138,769 individuals. *J Hypertens* 2011;29:623–35.
- [5] Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998;352:179–84.
- [6] Huang CC, Chan WL, Chen YC, Chen TJ, Lin SJ, Chen JW, et al. Angiotensin II receptor blockers and risk of cancer in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 2011;107:1028–33.
- [7] Chang CH, Lin JW, Wu LC, Lai MS. Angiotensin receptor blockade and risk of cancer in type 2 diabetes mellitus: a nationwide case-control study. *J Clin Oncol* 2011;29:3001–7.
- [8] Pasternak B, Svanstrom H, Callreus T, Melbye M, Hviid A. Use of angiotensin receptor blockers and the risk of cancer. *Circulation* 2011;123:1729–36.
- [9] Wilop S, von Hobe S, Crysandt M, Esser A, Osieka R, Jost E. Impact of angiotensin I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing first-line platinum-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1429–35.
- [10] Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *Eur J Cancer* 2011;47:1955–61.
- [11] Tatokoro M, Fujii Y, Kawakami S, Fukui N, Komai Y, Saito K, et al. Favorable response to combination treatment of cimetidine, cyclooxygenase-2 inhibitor and renin-angiotensin system inhibitor in metastatic renal cell carcinoma: report of three cases. *Int J Urol* 2008;15:848–50.
- [12] Chae YK, Valsecchi ME, Kim J, Bianchi AL, Khemasuwan D, Desai A, et al. Reduced risk of breast cancer recurrence in patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins. *Cancer Invest* 2011;29:585–93.
- [13] Lukic S, Nikolic A, Alempijevic T, Popovic D, Sokic Milutinovic A, Ugljesic M, et al. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Surg* 2011;28:258–62.
- [14] Sun M, Liu C, Wei F, Zhong J, Sun Y. Association of angiotensin I converting enzyme insertion/deletion polymorphism with breast cancer: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12:611–6.
- [15] Xi B, Zeng T, Liu L, Liang Y, Liu W, Hu Y, et al. Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system genes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:561–8.
- [16] Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol* 1997;272:R662–8.
- [17] Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt RE, Ellison KE. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 1986;8:544–8.
- [18] Campbell DJ, Habener JF. Hybridization in situ studies of angiotensinogen gene expression in rat adrenal and lung. *Endocrinology* 1989;124:218–22.
- [19] Re R. The myocardial intracellular renin-angiotensin system. *Am J Cardiol* 1987;59:56A–8A.
- [20] Campbell DJ, Bouhnik J, Menard J, Corvol P. Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. *Nature* 1984;308:206–8.
- [21] Skipworth JR, Szabadkai G, Olde Damink SW, Leung PS, Humphries SE, Montgomery HE. Review article: pancreatic renin-angiotensin systems in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:840–52.
- [22] Matsubara H, Sugaya T, Murasawa S, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, et al. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular

- localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron* 1998;80:25–34.
- [23] Juillerat-Jeanneret L, Celerier J, Chapuis Bernasconi C, Nguyen G, Wostl W, Maerki HP, et al. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma. *Br J Cancer* 2004;90:1059–68.
- [24] Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma. *Br J Cancer* 2010;103:1698–705.
- [25] Rhodes DR, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, et al. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10284–9.
- [26] Kinoshita J, Fushida S, Harada S, Yagi Y, Fujita H, Kinami S, et al. Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin. *Int J Oncol* 2009;34:1573–82.
- [27] Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T, Tanaka N, Maeda T, Kikuchi E, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression and microvessel density in human bladder cancer. *Urology* 2011;77:1009 [e1019–1025].
- [28] Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, et al. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 2008;99:160–6.
- [29] Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, et al. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2005;11:2686–94.
- [30] Takeda H, Kondo S. Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression. *Am J Pathol* 2001;158:1633–7.
- [31] Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Lett* 2001;495:197–200.
- [32] Pawlikowski M, Winczyk K, Sledz B. Immunohistochemical detection of angiotensin receptors AT1 and AT2 in adrenal tumors. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46:51–5.
- [33] Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nagasaka T, Nawa A, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumour angiogenesis and patient survival. *Br J Cancer* 2006;94:552–60.
- [34] Rocken C, Rohl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al. The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1206–12.
- [35] Kikkawa F, Mizuno M, Shibata K, Kajiyama H, Morita T, Ino K, et al. Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1258–63.
- [36] Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling. *J Gastrointest Surg* 2008;12:57–66.
- [37] Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Horiguchi Y, Murai M. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on tumor growth and angiogenesis in a xenograft model of human bladder cancer. *Hum Cell* 2007;20:1–9.
- [38] Zhao Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Fu S. Angiotensin II/angiotensin II type 1 receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway. *J Cell Physiol* 2010;225:168–73.
- [39] Bose SK, Gibson W, Giri S, Nath N, Donald CD. Angiotensin II up-regulates PAX2 oncogene expression and activity in prostate cancer via the angiotensin II type 1 receptor. *Prostate* 2009;69:1334–42.
- [40] Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, et al. Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 2001;88:22–9.
- [41] Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, et al. Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2003;196:370–7.
- [42] Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1139–47.
- [43] Zhao Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Wu J. Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:304–10.
- [44] Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, et al. Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109:418–25.
- [45] Kosaka T, Miyajima A, Shirotake S, Kikuchi E, Hasegawa M, Mikami S, et al. Ets-1 and hypoxia inducible factor-1alpha inhibition by angiotensin II type-1 receptor blockade in hormone-refractory prostate cancer. *Prostate* 2010;70:162–9.

- [46] Arafat HA, Gong Q, Chipitsyna G, Rizvi A, Saa CT, Yeo CJ. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 2007;204:996–1005 [discussion 1005–6].
- [47] Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF. Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci* 2008;53:1206–10.
- [48] Wasa J, Sugiura H, Kozawa E, Kohyama K, Yamada K, Taguchi O. The tumor suppressive effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist in a murine osteosarcoma model. *Anticancer Res* 2011;31:123–7.
- [49] Chow L, Rezmann L, Imamura K, Wang L, Catt K, Tikellis C, et al. Functional angiotensin II type 2 receptors inhibit growth factor signaling in LNCaP and PC3 prostate cancer cell lines. *Prostate* 2008;68:651–60.
- [50] Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CM, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:79–87.
- [51] Du N, Feng J, Hu LJ, Sun X, Sun HB, Zhao Y, et al. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep* 2012;27:1893–903.
- [52] Miyajima A, Asano T, Hayakawa M. Captopril restores transforming growth factor-beta type II receptor and sensitivity to transforming growth factor-beta in murine renal cell cancer cells. *J Urol* 2001;165:616–20.
- [53] Wang L, Cai SR, Zhang CH, He YL, Zhan WH, Wu H, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:2167–71.
- [54] Gong Q, Davis M, Chipitsyna G, Yeo CJ, Arafat HA. Blocking angiotensin II Type 1 receptor triggers apoptotic cell death in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2010;39:581–94.
- [55] Arnold SA, Rivera LB, Carlon JG, Toombs JE, Chang CL, Bradshaw AD, et al. Losartan slows pancreatic tumor progression and extends survival of SPARC-Null mice by abrogating aberrant TGFbeta activation. *PLoS One* 2012;7:e31384.
- [56] Uemura H, Ishiguro H, Ishiguro Y, Hoshino K, Takahashi S, Kubota Y. Angiotensin II induces oxidative stress in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2008;6:250–8.
- [57] Chehl N, Gong Q, Chipitsyna G, Aziz T, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II regulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in pancreatic cancer cells. *J Gastrointest Surg* 2009;13:2189–200.
- [58] Spychalowicz A, Wilk G, Sliwa T, Ludew D, Guzik TJ. Novel therapeutic approaches in limiting oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol* 2012 [Jan 20. Epub ahead of print].
- [59] Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer* 2010;10:134.
- [60] Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II type 1 antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002;62:4176–9.
- [61] Puddefoot JR, Udeozo UK, Barker S, Vinson GP. The role of angiotensin II in the regulation of breast cancer cell adhesion and invasion. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:895–903.
- [62] Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2010;59:630–7.
- [63] Suzuki K, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Nakatsue T, Fujioka Y, et al. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors play opposite roles in regulating the barrier function of kidney glomerular capillary wall. *Am J Pathol* 2007;170:1841–53.
- [64] Kawabata A, Baoum A, Ohta N, Jacquez S, Seo GM, Berkland C, et al. Intratracheal administration of a nanoparticle-based therapy with the angiotensin II type 2 receptor gene attenuates lung cancer growth. *Cancer Res* 2012;72:2057–67.
- [65] Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, et al. (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 2008;173:1911–8.
- [66] Kohl RR, Kolozsvary A, Brown SL, Zhu G, Kim JH. Differential radiation effect in tumor and normal tissue after treatment with ramipril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Radiat Res* 2007;168:440–5.
- [67] Yanase K, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kitade M, Kaji K, et al. Synergistic inhibition of hepatocellular carcinoma growth and hepatocarcinogenesis by combination of 5-fluorouracil and angiotensin-converting enzyme inhibitor via anti-angiogenic activities. *Oncol Rep* 2007;17:441–6.
- [68] Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, et al. Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9:6038–45.
- [69] Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, et al. Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities. *Oncol Rep* 2009;22:355–60.
- [70] Uemura H, Hasumi H, Kawahara T, Sugiura S, Miyoshi Y, Nakaigawa N, et al. Pilot study of angiotensin II receptor blocker in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Int J Clin Oncol* 2005;10:405–10.
- [71] Becker BN, Kondo S, Chen JK, Harris RC. Tyrosine kinase inhibition affects type 1 angiotensin II receptor internalization. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:975–93.

ANNEXE

VU :

Le Directeur de Thèse
Pr Cécile VIGNEAU

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Résumé

Contexte : Les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) sont des tumeurs particulièrement agressives et de mauvais pronostic lorsqu'elles sont métastatiques. L'apport des traitements anti-angiogéniques et notamment des inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI), a permis une amélioration nette en terme de survie de ces patients, mais parfois au prix d'effets secondaires tels que l'HTA. L'angiotensine-II stimule la croissance des cellules cancéreuses et la sécrétion de VEGF via le récepteur de type 1. Dans différents types de cancers, les antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine-II (ARA-2) utilisés à visée anti-hypertensive ont pu démontrer une diminution de la prolifération cellulaire et une inhibition de la néo-angiogénèse tumorale.

Objectif : Mettre au point différents modèles animaux de ccRCC et tester l'effet de l'association des traitements par sunitinib (TKI) et telmisartan (ARA-2).

Matériels & Méthodes : Des souris *Nude* ont été injectées avec des cellules tumorales 786-O, permettant d'obtenir une tumeur sous-cutanée. Les souris ont été réparties en 4 groupes gavées quotidiennement pendant 4 semaines : avec le vecteur (DMSO), du Telmisartan, du Sunitinib ou une association Telmisartan + Sunitinib à doses thérapeutiques, puis euthanasiées pour analyse de la tumeur. Dans un 2^{ème} temps, un autre modèle animal a été mis au point avec des cellules tumorales issues d'une lignée primaire.

Résultats : L'association des traitements (TKI + ARA-2) dans le 1^{er} modèle montrait une augmentation de la nécrose tumorale par diminution de la densité microvasculaire et de la sécrétion de VEGF circulant. Dans le modèle issu d'une lignée primaire, on notait une réduction du volume tumoral mais sans augmentation de la nécrose.

Conclusion : Ce travail a permis de mettre au point 2 modèles de ccRCC.

L'association d'un ARA-2 au sunitinib semble potentialiser l'effet anti-tumoral dans ces modèles expérimentaux. De plus amples études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués.